

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Bryan Augusto da Rosa Tavares

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE FUNÇÃO DESCONHECIDA DE *Mycoplasma
hyopneumoniae* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE DETERMINANTES DA PNEUMONIA
ENZOÓTICA SUÍNA**

Porto Alegre

2019

Bryan Augusto da Rosa Tavares

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE FUNÇÃO DESCONHECIDA DE
Mycoplasma hyopneumoniae PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
DETERMINANTES DA PNEUMONIA ENZOÓTICA SUÍNA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase na área molecular, celular e funcional na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer
Ferreira

Coorientadora: Dr. Jéssica Andrade Paes
Vieira

Porto Alegre

2019

Ao Criador

*“God of creation
There at the start
Before the beginning of time
With no point of reference
You spoke to the dark
And fleshed out the wonder of ligh.”*

Joel Houston, Benjamin Hastings e Michael Fatkin

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aleckssandro Tavares e Patrícia da Rosa Tavares, por toda educação, ensino e amor que me legaram, pelas conversas no café da manhã, e por me incentivarem e sustentarem durante esta jornada.

Aos meus avós, por todo incentivo aos estudos, por todas as histórias compartilhadas, e pelo cuidado, carinho e amor.

Ao meu orientador, Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, por todo o ensinamento, dedicação e auxílio no desenvolvimento deste estudo, como no meu amadurecimento como biólogo.

À Dr. Jéssica Paes pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos, e por todas as conversas, incentivos, correções e ajudas nos experimentos.

Aos professores, doutores, mestres e colegas de graduação do Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos pelo companheirismo, auxílio e cafés compartilhados.

Aos irmãos, amigos e companheiros que suportaram minhas piadas sem graça sobre biologia e ciências.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Características gerais e evolução de bactérias do gênero <i>Mycoplasma</i>	12
1.2 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e a pneumonia enzoótica suína.....	13
1.3 Controle de infecções por <i>M. hyopneumoniae</i>	15
1.4 Determinantes de patogenicidade de <i>M. hyopneumoniae</i>	16
1.5 Genômica estrutural e funcional de <i>M. hyopneumoniae</i>	17
1.6 Justificativas.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Análises <i>in silico</i> das sequências de aminoácidos de proteínas.....	21
3.1.1 Predições para anotação funcional.....	21
3.1.1.1 Predições de localização subcelular.....	21
3.1.1.2 Predições de vias de secreção.....	21
3.1.1.3 Predições de função baseadas em ortologia.....	22
3.1.1.3.1 Classificação funcional por ontologia gênica.....	22
3.1.1.3.2 Classificação funcional por domínios e motivos funcionais.....	22
3.1.2. Predições de associação à virulência.....	22
3.2 Seleção de potenciais fatores de virulência para caracterização funcional e imunológica...23	
3.3 Produção da proteína recombinante de interesse.....	23
3.3.1. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	23
3.3.2 Avaliação de solubilidade e solubilização da proteína recombinante.....	24
3.3.3 Purificação da proteína recombinante.....	24
4. RESULTADOS.....	25

4.1 Anotação funcional de proteínas de função desconhecida de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448.....	25
4.2 Potenciais fatores de virulência.....	27
4.3 Seleção de proteína para caracterização funcional e imunológica.....	28
4.4 Produção da proteína rMhp7448_0148.....	29
5. DISCUSSÃO.....	33
6. PERSPECTIVAS.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CDS – Sequência de DNA codificante

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

GO – Ontologia gênica

h – Hora(s)

IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kb – Kilobases

kDa – Kilodalton

LB – Meio Luria-Bertani

mM – Milimolar

min – Minuto(s)

OD – Densidade óptica

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da DNA polimerase

PES – Pneumonia enzoótica suína

PRRSV – Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina

RNA – ácido ribonucleico

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SVM – Máquina de vetores de suporte

μ m – Micrometros

°C – Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética da família Mycoplasmataceae.....	13
Figura 2: Número de proteínas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 com a localização subcelular e vias de secreção das proteínas extracelulares preditas.....	26
Figura 3: Número de proteínas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 com função predita.....	27
Figura 4: Números de proteínas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 com localização subcelular, função e/ou associação a virulência preditos.....	28
Figura 5: Expressão da rMhp7448_0148 em diferentes linhagens de <i>E. coli</i> e com diferentes tempos de indução.....	30
Figura 6: Avaliação de solubilidade da rMhp7448_0148.....	31
Figura 7: Avaliação da purificação da rMhp7448_0148.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 potencialmente associadas a virulência selecionadas para caracterização funcional e imunológica (proteínas-alvo).....	28
---	----

RESUMO

Mycoplasma hyopneumoniae, como um micoplasma típico, é um dos menores organismos autorreplicantes de vida livre, com ausência de parede celular e um genoma de tamanho reduzido. Esta bactéria habita o trato respiratório de suínos, sendo o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína, doença crônica que gera perdas econômicas significativas à indústria de suínos em todo mundo. O genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 tem 695 sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) codificadoras, sendo que 277 delas são codificadoras de proteínas não-caracterizadas ou hipotéticas. As proteínas não-caracterizadas e hipotéticas constituem um grupo de proteínas de função desconhecida, o qual pode incluir fatores de virulência ainda não identificados e descritos. O objetivo geral deste estudo foi realizar a anotação funcional de proteínas de função desconhecida codificadas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, para a identificação de novos potenciais determinantes de patogenicidade da pneumonia enzoótica suína. Para isso, foram realizadas análises para a predição de localização subcelular, de função molecular e de associação a virulência para as 277 proteínas anotadas como de função desconhecida e codificadas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. No total, 115 proteínas foram anotadas funcionalmente, das quais 101 foram preditas como associadas a virulência. A maioria das proteínas foram anotadas como enzimas, transportadores de membrana ou como proteínas associadas à expressão gênica. A partir destes resultados, dez proteínas foram selecionadas como potenciais alvos para caracterização funcional e imunológica. Dentre estes potenciais alvos, a proteína Mhp7448_0148 foi selecionada para produção da sua versão recombinante (rMhp7448_0148) e posterior caracterização funcional e imunológica. Esta proteína foi predita como uma chaperona, contendo o domínio funcional de uma proteína de choque térmico de 33 kDa (hsp33). A rMhp7448_0148 foi produzida em *Escherichia coli* e purificada na forma desnaturada. Por isso, a proteína desnaturada será inicialmente utilizada para ensaios de caracterização imunológica. Os ensaios funcionais poderão ser realizados a partir da padronização da produção e purificação da rMhp7448_0148 na forma nativa.

Palavras-chave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, anotação funcional, virulência, proteína de choque térmico 33.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae, as typical mycoplasma, is one of the smallest self-replication free living organism, with lack cell wall and small genome. This bacterium inhabits the swine respiratory tract, and is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia, which is chronic disease that causes significant economic losses at swine industry worldwide. *M. hyopneumoniae* 7448 genome codes for 695 proteins, being 277 hypothetical and uncharacterized ones. These uncharacterized and hypothetical proteins constitute a group of proteins of unknown functions which may include virulence factors not identified and described yet. The aim of this work was the functional annotation of unknown function protein encoded by *M. hyopneumoniae* 7448 genome, in order to identify new potential porcine enzootic pneumonia pathogenicity determinants. For that, *in silico* analyses were performed to predict subcellular location, molecular functions and association to virulence. Overall, 115 proteins were functionally annotated, including 101 proteins predicted as associated to virulence. Most of the proteins were annotated as enzymes, membrane transporters or as proteins associated to gene expression. Based on these results, ten proteins were selected as potential targets for functional and immunological characterization. Among these potential targets, the Mhp7448_0148 protein was selected for its recombinant version production (rMhp7448_0148) and subsequent functional and immunological characterization. This protein was predicted as a chaperone, bearing the heat shock protein 33 functional domain (hsp 33). The rMhp7448_0148 was produced in *Escherichia coli* and was purified in its denatured form. Therefore, the denatured protein will be initially used for immunological characterization assays. The functional assays will be performed after the standardization of the production and purification of rMhp7448_0148 in native form.

Key-words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, functional annotation, virulence, heat shock protein

33.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais e evolução de bactérias do gênero *Mycoplasma*

Mycoplasma é um gênero bacteriano parafilético pertencente a classe monofilética mollicutes do filo firmicutes (que inclui ainda as classes: Bacilli, e Clostridia) (Wolf *et al.*, 2004). A origem evolutiva dos mollicutes está relacionada a bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo G + C, as quais passaram por um processo de evolução regressiva, com redução do genoma, há cerca de 605 milhões de anos (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007). A diminuição do genoma dos mollicutes ocorreu pela perda de genes não essenciais, tendo as características genéticas semelhantes (conservadas) às de seus ancestrais. A maioria das perdas genéticas maciças ocorreu em um estágio inicial deste processo evolutivo, mas, sendo as espécies de mollicutes parasitas ou comensais, a co-evolução com seus hospedeiros também contribuiu para moldar a composição gênica dos genomas dessas bactérias.

Os mollicutes tem um pequeno tamanho celular (0,2 – 0,4 µm de diâmetro), ausência de uma parede celular, um genoma de tamanho reduzido (600 kb à 2200 kb) e vias metabólicas simplificadas (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007). A maioria dos mollicutes são patogênicos, podendo infectar seres humanos, animais e plantas. Relativamente pouco se sabe sobre os genes relacionados a sua patogenicidade e virulência. Os genomas de espécies de mollicutes não apresentam uma organização geral (distribuição de G + C, polarização e organização gênica) semelhante, nem apresentam sintenia (blocos de genes conservados em conjuntos ordenados ao longo do cromossomo). Além disso, a perda contínua de genes pode ser observada comparando conjuntos de genes dentro de cada ramo filogenético dos mollicutes.

Os micoplasmas são pleomórficos, tem um códon universal de parada (códon UGA) convertido para códon de triptofano e são hospedeiro-específicas. Os micoplasmas são incapazes de sintetizarem ácidos graxos, requerendo esterol proveniente do hospedeiro para o crescimento (Fadiel *et al.*, 2007). Embora os mollicutes apresentem uma falta de sintenia no seu genoma, a espécie de *Mycoplasma hyopneumoniae* apresenta longas regiões com ordem gênica conservada entre suas linhagens, e com espécies estreitamente relacionadas. As espécies do gênero *Mycoplasma* (micoplasmas) pertencem predominantemente a família Mycoplasmataceae, a qual está dividida em seis clados: bovis (*Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma*

fermentans), *hominis* (*Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma arthritidis*), *hyopneumoniae* (*Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma conjunctivae*, *Mycoplasma flocculare* e *M. hyopneumoniae*), micoplasma hematófíco (*Mycoplasma suis* e *Mycoplasma haemofelis*), genitalium-pneumoniae (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma pneumoniae*) e *mycoides* (*Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma leachii* e *Mycoplasma mycoides*) (Figura 1) (Siqueira *et al.*, 2013).

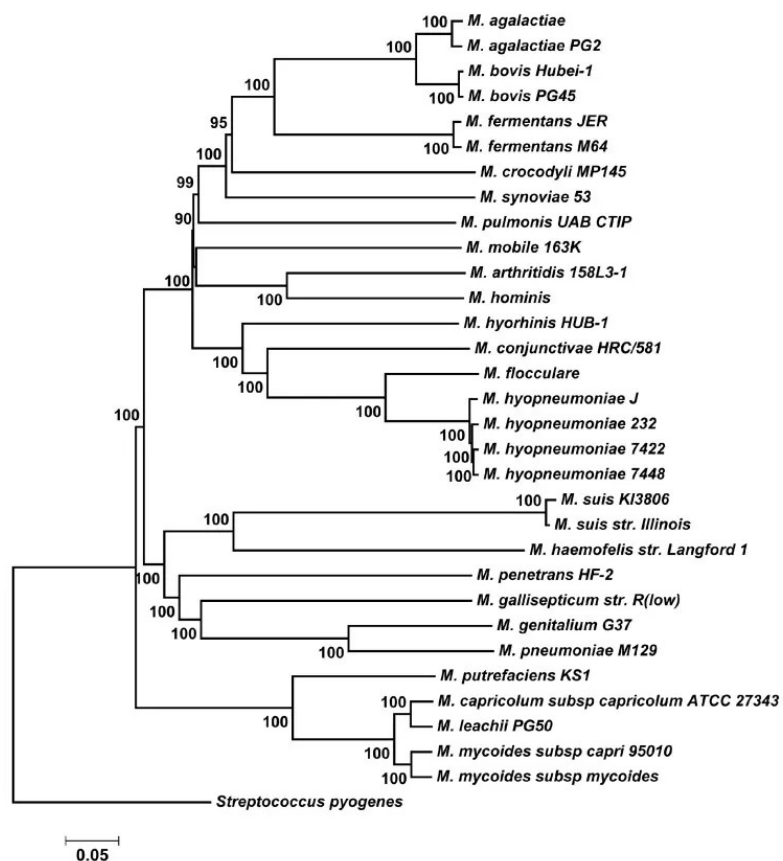


Figura 1: Árvore filogenética da família Mycoplasmataceae. História evolutiva de micoplasmas representada em uma árvore filogenética obtida por abordagem filogenômica (Siqueira *et al.*, 2013).

1.2 *Mycoplasma hyopneumoniae* e a pneumonia enzoótica suína

M. hyopneumoniae pertence ao grupo *hyopneumoniae* de Mycoplasmataceae e é estreitamente relacionado com *M. flocculare*, *M. hyorhinis* e *M. conjunctivae*. *M. hyopneumoniae* habita o trato respiratório de suínos, sendo o agente etiológico da pneumonia enzoótica suína

(PES) (Razin *et al.*, 1998; Sirand-Pugnet *et al.*, 2007). *M. flocculare* e *M. hyorhinis* habitam também o trato respiratório de suínos, porém são espécies comensais.

M. hyopneumoniae se adere ao epitélio ciliado da traqueia, brônquios e bronquíolos, causando ciliostose (Maes *et al.*, 2018). A bactéria é também capaz de evasão imunológica, por modulação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, apesar de ser predominantemente extracelular, *M. hyopneumoniae* pode eventualmente ser internalizado na célula do hospedeiro, e assim, se disseminar para os órgãos internos e persistir dentro do hospedeiro sem causar doença.

A PES é uma doença crônica respiratória de ocorrência mundial, que causa grandes perdas econômicas aos produtores de suínos, pois reduz o ganho médio de massa dos porcos e aumenta quantidade de antimicrobianos utilizados (Maes *et al.*, 2018). Rebanhos de suínos com PES apresentam alta morbidade, baixa mortalidade, tosse crônica e retardo no crescimento. A resposta imunológica do hospedeiro é considerada a principal causa de lesões pulmonares.

A infecção pulmonar do suíno por *M. hyopneumoniae* oportuniza ainda infecções secundárias por outras bactérias, como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Bordetella bronchiseptica*, e vírus, como o circovírus porcino e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV) (Maes *et al.*, 2018). Além de prolongar e aumentar a gravidade da PRRSV, assim como agravar as lesões pulmonares e linfoides associadas ao circovírus suíno tipo 2. A PRRSV causa anorexia, tosse, e em fêmeas gestantes causa abortos e/ou nascimentos precoces, e causa grande perda aos rebanhos infectados.

O diagnóstico da PES pode ser realizado por isolamento de *M. hyopneumoniae*, porém a multiplicação lenta e a multiplicação de outras bactérias dificultam seu isolamento (Maes *et al.*, 2018). Também existem técnicas de diagnóstico baseadas em imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), sendo atualmente a PCR em tempo real um dos métodos mais comuns, pois aumenta a detecção em diferentes tipos de amostras e apresenta alta sensibilidade e especificidade. O diagnóstico a partir de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* é realizado por testes de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), tendo como desvantagem a não discriminação da origem do anticorpo, se de suínos vacinados ou com infecção aguda, além de uma incapacidade de detecção de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* com infecção crônica.

1. 3 Controle de infecções por *M. hyopneumoniae*

As tetraciclina, macrólidos, lincosaminas, pleuromucotilinas, fluoroquinolonas, florfenicol, aminoglicosídeos e aminociclitolis são antimicrobianos eficientes contra *M. hyopneumoniae* (Chernov *et al.*, 2018). Por carecer de parede celular, *M. hyopneumoniae* é naturalmente resistente a antimicrobianos que interferem na polimerização da parede celular. Além disso, já foi registrada também resistência adquirida a alguns outros antimicrobianos, como as tetraciclina. A maioria dos antimicrobianos testados em suínos contra *M. hyopneumoniae*, diminuíram as lesões pulmonares e os sinais clínicos da PES (Maes *et al.*, 2018). Porém a PES tende a ressurgir após o fim do período de tratamento com antimicrobianos, pois diferentes linhagens com diferentes suscetibilidades aos antimicrobianos podem coexistir em um rebanho (Chernov *et al.*, 2018).

A vacinação contra *M. hyopneumoniae* é realizada principalmente com bacterinas, que são constituídas por células de *M. hyopneumoniae* inativadas ou atenuadas (Tao *et al.*, 2019). Atualmente, as vacinas comerciais oferecem apenas proteção parcial, tendo um efeito limitado no controle da transmissão e incapacidade de impedir a colonização. A maioria das bacterinas comerciais é baseada na linhagem J de *M. hyopneumoniae*, a qual é classificada como uma linhagem não patogênica (Matthijs *et al.*, 2019). Os principais efeitos da vacinação são uma redução nos sintomas clínicos, lesões pulmonares, uso de medicamentos e perdas de desempenho. Esses efeitos podem variar entre os rebanhos de suínos, o que pode ser parcialmente explicado por diferenças antigênicas e patogênicas entre as linhagens presentes no rebanhos e as linhagens utilizadas na formulação das vacinas (Pieters *et al.*, 2010).

Embora, a vacinação contra *M. hyopneumoniae* seja baseada em bacterinas, alguns antígenos como proteínas de superfície e adesinas já foram caracterizados imunologicamente (Mointinho-Silva *et al.*, 2012; Simionatto *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2019). Porém a maioria das proteínas recombinantes foi avaliada apenas em camundongos, e poucas testadas em suínos (Maes *et al.*, 2018). As vacinas com proteínas recombinantes com base em um único antígeno são pouco imunogênicas, porém novos adjuvantes vêm aumentando significativamente seu potencial imunogênico (Virginio *et al.*, 2014). As vacinas com proteínas recombinantes compostas por múltiplos antígenos apresentam uma vantagem substancial na imunogenicidade em comparação as vacinas comerciais atuais, sendo, no entanto, necessários mais testes em suínos. O

desenvolvimento de vacinas mais efetivas contra *M. hyopneumoniae* vem sendo proposto, e as vacinas com proteínas recombinantes tem se apresentado como uma alternativa viável e eficiente no seu controle.

1.4 Determinantes de patogenicidade de *M. hyopneumoniae*

Micoplasmas em geral carecem de fatores de virulência clássicos, como toxinas bacterianas (Maes *et al.*, 2018). No caso de *M. hyopneumoniae*, a adesão como estágio inicial para a colonização bacteriana do epitélio foi extensamente estudada, porém o mecanismo de aderência aos cílios não está completamente elucidado. Estudos experimentais comparativos confirmaram que adesinas (p97, p216, p102) desempenham um papel importante na virulência e patogênese (Razin *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2007; Reolon *et al.*, 2014). No entanto, não existem fatores bem definidos que difiram entre linhagens patogênicas e não patogênicas ou com diferentes níveis de virulência de *M. hyopneumoniae*, nem entre *M. hyopneumoniae* e espécies estreitamente relacionadas, como *M. flocculare*, bactéria comensal que também habita o trato respiratório de suínos.

Há uma variabilidade de linhagens circulantes nos rebanhos de suíno (Maes *et al.*, 2018). As linhagens de *M. hyopneumoniae* apresentam diferentes níveis de patogenicidade, sendo encontradas linhagens não patogênicas como a linhagem J e linhagens patogênicas como a linhagem 7448. No genoma de *M. hyopneumoniae* foram identificadas variações repetitivas em tandem entre proteínas ortólogos nas diversas linhagens (De Castro *et al.*, 2006). Inserções e deleções resultam em variações no número de repetições de nucleotídeos em tandem nas regiões codificadoras, o que é indicativo de um mecanismo molecular que gera variantes funcionais e/ou antigênicas nas proteínas de superfície. O número de repetições de aminoácidos variam nas adesinas e outros fatores putativos de virulência ortólogos nas linhagens 7448, 232 e J de *M. hyopneumoniae* (Pinto *et al.*, 2007). Provavelmente a variação nas proteínas de superfície seja um determinante dos diferentes níveis de patogenicidade de cada linhagem de *M. hyopneumoniae*.

A análise comparativa do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 (patogênica) e J (não patogênica) revela uma alta similaridade, em termos de repertório, distribuição de genes e de conservação de sequências entre genes ortólogos (Vasconcelos, A. T. *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2013). A genômica comparativa não correlacionou os fatores determinantes da virulência as

diferenças de patogenicidade das linhagens analisadas. A presença de genes ortólogos codificadores de proteínas determinantes de patogenicidade (fatores de virulência) tanto em linhagens patogênicas como em não patogênicas sugere que a patogenicidade e virulência diferenciais depende de diferenças em nível de expressão gênica e/ou processo pós-traducionais, como processamento proteolítico e/ou secreção destes fatores (Ferrarini *et al.*, 2016; Paes *et al.*, 2018).

1.5 Genômica estrutural e funcional de *M. hyopneumoniae*

O genoma de dez linhagens de *M. hyopneumoniae* foram sequenciados completamente (J, KM014, ES-2, 168, 168-L, 7448, 7422, F7.2C, 232, NCRC10127) (NCBI, 2019). O tamanho do genoma dentre as linhagens varia de 892.758 a 964503 pares de base, com conteúdo G+C compondo cerca de 28% dos genomas. As sequências de DNA codificadoras (CDSs) entre as linhagens de *M. hyopneumoniae* variam de 526 (linhagem KM014) a 695 (linhagem 7448) (Han *et al.*, 2017; Paes *et al.*, 2018).

M. hyoneumoniae 7448 é uma das linhagens patogênicas com genoma totalmente sequenciado, isolada de um suíno infectado em Santa Catarina, Brasil (Vasconcelos, A. T. *et al.*, 2005). O genoma dessa linhagem tem 920.079 pares de base, 28,5% de conteúdo G+C e um total de 695 CDSs. Sendo que dessas 695 CDS, 418 (60%) são anotadas funcionalmente.

A validação experimental do proteoma predito de *M. hyopneumoniae* 7448 foi possível para 344 CDSs por espectrometria de massas (Siqueira *et al.*, 2013; Paes *et al.*, 2017; Paes *et al.*, 2018). No entanto, algumas proteínas mesmo validadas experimentalmente continuam sem anotação funcional, e somando a proteínas hipotéticas (sem validação experimental) totalizam 277 proteínas de função desconhecida codificadas pelas CDSs de *M. hyopneumoniae* 7448.

M. hyopneumoniae 7448 compartilha cerca de 70% das proteínas identificadas por proteômica com *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*, revelando diferenças qualitativas e quantitativas nos repertórios proteicos destas bactérias (Leal *et al.*, 2016; Paes *et al.*, 2017; Paes *et al.*, 2018; Paes *et al.*, 2019). As proteínas diferencialmente abundantes entre *M. hyopneumoniae* 7448 e suas contrapartes não patogênicas foram consideradas como fatores de virulência de *M. hyopneumoniae*. Dentre os potenciais fatores de virulência estão adesinas, proteases, proteínas de equilíbrio redox e transportadores de membrana. Os fatores de virulência

em *M. hyopneumoniae* 7448 podem atuar em mecanismos alternativos de sobrevivência da bactéria em condições de estresse oxidativo e térmico (Ferrarini *et al.*, 2016; Galvão Ferrarini *et al.*, 2018). Proteínas de função desconhecida também foram relacionadas a resposta ao estresse oxidativo e térmico, porém sua atuação na resposta ao estresse bacteriano e na patogenicidade ainda não foram elucidados (Madsen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2019).

1.6 Justificativas

Muitas das vias metabólicas em *M. hyopneumoniae* permanecem desconhecidas, fazendo com que processos biológicos essenciais para a sobrevivência e colonização do trato respiratório de suínos não estejam completamente elucidados. A atuação diferencial de mecanismos e vias metabólicas nos processos biológicos entre as contrapartes não patogênicas de *M. hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*) pode estar relacionada ao nível de virulência variado entre elas. A elucidação dos mecanismos moleculares, vias metabólicas e processos biológicos é dificultada por uma ausência de anotação funcional de grande parte das CDSs de *M. hyopneumoniae*. A anotação funcional das CDSs de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* pode permitir o descobrimento dos processos biológicos de *M. hyopneumoniae* os quais podem estar associados a virulência.

Apesar de todos os esforços até o presente momento para a anotação do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, ainda restam 277 CDSs de função desconhecida no genoma, cerca de 40% das 695 CDSs. A grande proporção de CDSs de proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* sugere que estas possam constituir um importante reservatório de potenciais fatores de virulência ainda não identificados nem caracterizados. Desta forma, são necessárias ainda análises abrangentes para complementação da anotação funcional dessas CDSs.

A complementação da anotação funcional pode ser realizada por análise *in silico* das CDSs com base em comparações e buscas em bancos de dados atualizados. Essa abordagem é capaz de fornecer uma maneira eficiente de predição, assim como realizado para proteínas de função desconhecida de *M. pneumoniae* (Shahbaaz *et al.*, 2015) e algumas linhagens de *M. hyopneumoniae* (Li *et al.*, 2019). A partir de predições *in silico*, novos estudos de caracterização funcional e/ou imunológica de proteínas de função desconhecida poderão ser realizados, permitindo a identificação de possíveis novos determinantes de patogenicidade de *M.*

hyopneumoniae. A fim de complementar esse conhecimento atualmente fragmentário, são necessárias anotações precisas de proteínas de função desconhecida. A identificação e caracterização dos produtos destas CDSs atualmente de função desconhecidas poderá também proporcionar novos alvos para o desenvolvimento de testes diagnósticos, testes de virulência diferencial entre as linhagens, fármacos e/ou vacinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral a anotação funcional do repertório de proteínas de função desconhecida codificadas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448, para identificação e caracterização de novos potenciais determinantes de patogenicidade da PES.

2.2 Objetivos específicos

I - Anotação *in silico* de proteínas ainda classificadas como de função desconhecida no proteoma predito de *M. hyopenumoniae* 7448.

II - Identificação de proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* 7448 potencialmente relacionadas à virulência.

III - Seleção de potenciais novos determinantes de patogenicidade de *M. hyopeumoniae*.

IV - Clonagem e expressão de uma sequência de DNA codificadora (CDS) de uma proteína de função desconhecida potencialmente relacionada com a determinação de patogenicidade de *M. hyopneumoniae* 7448 para produção da proteína recombinante correspondente.

V - Caracterização funcional e imunológica da proteína recombinante produzida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análises *in silico* das sequências de aminoácidos de proteínas

Os dados referentes às sequências deduzidas de aminoácidos de proteínas codificadas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 foram obtidos na base de dados do Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Foram recuperadas 277 sequências deduzidas de aminoácidos, referentes a todas as CDSs de função desconhecida anotadas no genoma da bactéria.

3.1.1 Predições para anotação funcional

Predições funcionais *in silico* foram realizadas para todas as 277 proteínas anotadas como de função desconhecida no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448. Utilizando uma variedade de ferramentas computacionais foram realizadas predições de localização subcelular, de vias de secreção e de função.

3.1.1.1 Predições de localização subcelular

A predição de localização subcelular foi realizada utilizando os programas PSORTb (Yu *et al.*, 2010), PSLpred (Bhasin *et al.*, 2005) e LOCTree3 (Goldberg *et al.*, 2014), os quais classificam as proteínas como localizadas no citoplasma, na membrana plasmática, na parede celular, na fração extracelular ou em compartimento desconhecido. A fim de melhor suportar as predições realizadas pelos programas de predição de localização subcelular, a presença de domínios transmembrana foi verificada pelos programas HMMTOP (Tusnády and Simon, 2001), THMM (Krogh *et al.*, 2001) e Phobius (Käll *et al.*, 2007).

3.1.1.2 Predições de vias de secreção

Das 277 proteínas analisadas na Seção 3.1.1.1, as proteínas preditas como localizadas na fração extracelular foram submetidas à predição das vias de secreção (secreção clássica ou não clássica), utilizando os programas SignalP (Emanuelsson *et al.*, 2007), Phobius (Käll *et al.*, 2007) e SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2005).

3.1.1.3 Predições de função baseadas em ortologia

3.1.1.3.1 Classificação funcional por ontologia gênica

A classificação funcional das proteínas por ontologia gênica (GO) foi realizada pelo programa BLAST2GO (Conesa *et al.*, 2005), baseado no alinhamento com o algoritmo BLAST com sequências depositadas em diversos bancos de dados biológicos com sequências proteicas não redundantes (CDS traduzidas do GenBank, PDB, SwissProt, PIR e PRF). Dentre as proteínas com ortólogos identificados e GO anotada, foram selecionadas as proteínas classificadas dentro da categoria de função molecular.

3.1.1.3.2 Classificação funcional por domínios e motivos funcionais

Os domínios funcionais foram preditos usando vários bancos de dados, como Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), SUPERFAMILY (Gough *et al.*, 2001), CATH (Orengo *et al.*, 1997), CDART (Geer *et al.*, 2002), SMART (Letunic *et al.*, 2012) e SBASE (http://pongor.itk.ppke.hu/protein/sbase.html#/sbase_blast). Além da predição de famílias de receptores acoplados a proteína G, utilizando GPCRpred (Bhasin and Raghava, 2004).

3.1.2. Predições de associação à virulência

As proteínas foram analisadas quanto a potenciais associações a virulência utilizando a ferramenta VirulentPred (Garg and Gupta, 2008), a qual utiliza os métodos baseados em máquina de vetores de suporte (SVM) para identificar fatores de virulência bacterianos putativos. Além disso, estas proteínas foram analisadas utilizando o banco de dados de fatores de virulência (VFDB) (Chen *et al.*, 2005). O potencial citotóxico das proteínas foi aferido utilizando os programas BTXPred (Saha and Raghava, 2007), e DBETH (Chakraborty *et al.*, 2012). O potencial alergênico foi aferido pelo programa AlgPred (Saha and Raghava, 2006). Para complementar a predição de fatores de virulência, foi realizada a busca de similaridade com genes (e seus produtos) de resistência a antibióticos no banco de dados CARD (<https://card.mcmaster.ca>).

3.2 Seleção de potenciais fatores de virulência para caracterização funcional e imunológica

Os resultados das predições *in silico* foram utilizados para a seleção de proteínas-alvo de interesse para caracterização funcional e imunológica. Dentre as 277 proteínas de função desconhecida analisadas *in silico*, foram então selecionadas as proteínas que tiveram: (i) anotação funcional; (ii) predição de associação a virulência; a (iii) abundância diferencial em relação a proteínas ortólogas de *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*.

Adicionalmente, foram preditas as propriedades físico-químicas das proteínas selecionadas de interesse utilizando o *software* EXPASY's PROTPARAM (<https://web.expasy.org/protparam>). Uma das proteínas selecionadas para caracterização funcional e imunológica foi escolhida para ser produzida no presente estudo, tendo como critério a relação com função potencialmente vital para *M. hyopneumoniae*. O clone plasmidial foi produzido a partir da síntese química da CDS de interesse e clonagem no vetor de expressão pET-15b (GeneOne) digerido com as enzimas NdeI e XhoI.

3.3 Produção da proteína recombinante de interesse

3.3.1. Expressão heteróloga em *Escherichia coli*

As células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysE, *E. coli* BL21 (DE3) códon Plus RP, *E. coli* BL21 (DE3) códon Plus Ril e *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen) foram transformadas por choque térmico com o clone plasmidial. Todas as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) ou LB ágar, com concentrações de 50 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. As linhagens de *E. coli* utilizadas tem resistência a cloranfenicol e o clone plasmidial, por causa do vetor pET-15b, confere resistência a ampicilina.

As linhagens de *E. coli* transformantes foram cultivadas a 37°C até atingirem a densidade óptica de 0,7. A expressão da proteína recombinante foi realizada nas diferentes linhagens de *E. coli* transformantes, utilizando 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) durante 3 h, 6 h, e 12 h de indução, à 37°C. A ausência de IPTG foi utilizada como controle negativo da expressão da proteína recombinante. Os resultados do teste

de indução foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%.

3.3.2 Avaliação de solubilidade e solubilização da proteína recombinante

O teste de solubilidade da proteína recombinante foi realizado com *E. coli* (DE3) Star induzida a 3h com 0,1 mM de IPTG. Após a indução as células foram lisadas por sonicação e a fração insolúvel e solúvel foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

Após a expressão da proteína recombinante, as células foram submetidas a processos para solubilização da proteína recombinante. A solubilização foi realizada com N-laurilsarcosina nas concentrações de 0,3% e 0,5%, e com ureia e hidrocloreto de guanidina conforme as instruções do fabricante (GE Healthcare Life Sciences). Os resultados do teste de solubilidade foram analisados por SDS-PAGE 12%.

3.3.3 Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade de metal imobilizado. Para isso, a resina *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare Life Sciences) foi carregada com NiSO₄ 400 mM e a fração solúvel foi adicionada. Os tampões utilizados na resina foram utilizados conforme as instruções do fabricante.

A eluição da proteína recombinante foi testada com adição de concentrações crescentes de imidazol e com eluição com tampão PBS 1X SDS 0,1% à 100°C por 1 min. Os resultados foram analisados por SDS-PAGE 12%.

4. RESULTADOS

4.1 Anotação funcional de proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* 7448

As 277 proteínas de função desconhecida tiveram suas sequências de aminoácidos analisados em diferentes programas de bioinformática para predição de localização subcelular, predição de função e associação a virulência. Os resultados dos programas foram concatenados em predições consenso, e assim utilizados para a anotação funcional *in silico* das proteínas.

A predição de localização subcelular classificou as proteínas citoplasmáticas, de membrana plasmática ou extracelulares. Visto que micoplasma carece de parede celular, as predições de proteínas periplasmáticas ou de parede celular, foram consideradas como proteínas extracelulares. No total das 277 proteínas, 239 (86%) apresentaram predição de localização subcelular (Material suplementar 1). Assim, foram preditas 83 (30%) proteínas como citoplasmáticas, 93 (33,5%) como de membrana citoplasmática e 63 (22,5%) extracelulares (Figura 2).

As proteínas preditas como extracelulares foram analisadas quanto ao mecanismo de exportação, para tanto foram usados programas que buscaram por peptídeo sinal, relacionado a via clássica de exportação de proteínas para o compartimento extracelular. A partir desses resultados foram concatenados uma predição consenso classificadas entre exportadas por via clássica, e exportadas por via não-clássica. O mecanismo de exportação foi predito para todas as proteínas extracelulares, sendo 18 por via clássica e 45 por via não-clássica.

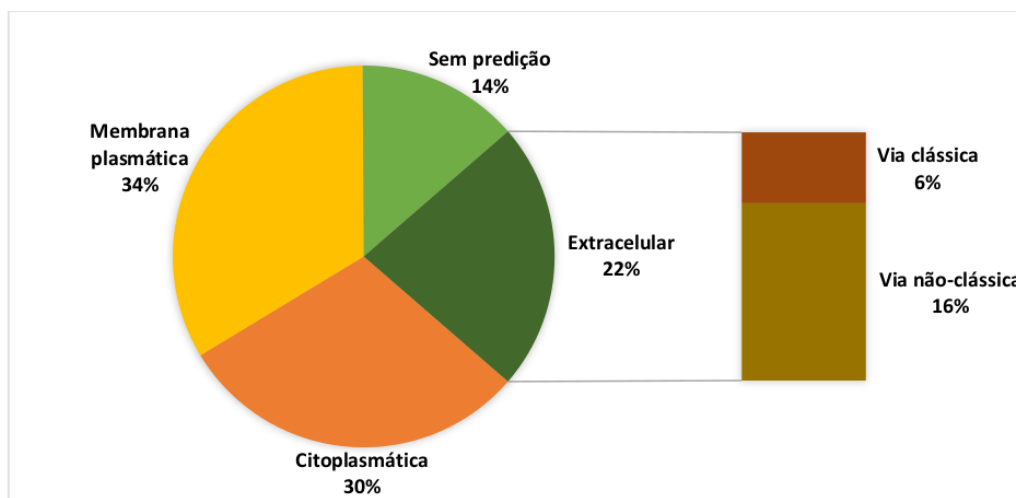


Figura 2: Número de proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 com a localização subcelular e vias de secreção das proteínas extracelulares preditas. As cores no gráfico de setores representam as diferentes localizações subcelulares preditas e/ou ausência de previsão. Os números indicam a quantidade de proteínas com a localização subcelular predita naquele compartimento. A categoria de proteínas preditas como extracelulares foi representada também por uma barra para diferenciação das diferentes vias de exportação.

A classificação funcional das proteínas por ontologia gênica foi atribuída aquelas proteínas com função molecular predita, tendo 56 (20%) proteínas a função molecular identificada (Material suplementar 2). Algumas proteínas tiveram mais de uma função molecular predita. As funções moleculares anotadas foram de hidrolases, peptidases, fatores de transcrição, transportadores de membrana, helicases, transferases, nucleases, ligases, adenosina trifosfatases (ATPases), cinases, oxirredutases, isomerases, desidrogenases, aldolases e fatores de transcrição e tradução.

A classificação funcional das proteínas por domínios foi atribuída aquelas proteínas com domínios identificados em pelo menos um dos programas de previsão, tendo 122 (44%) proteínas domínios identificados (Material suplementar 3). Algumas proteínas tiveram mais de um domínio funcional predito. Foram preditos domínios funcionais de ATPases, transportadores de membrana, álcool desidrogenases, chaperonas, hidrolases, esterases, DNA-metilases, DNA-polimerases, fosfatases, dinucleotídeo de flavina e adenina sintase (FAD-sintases), cinases, laminina, lactamases, transferases, peptidases e fatores de transcrição, ribonucleases e de regiões ricas em leucina.

A partir das funções moleculares recuperadas da ontologia gênica de função molecular e de domínios funcionais, foi possível a classificação de função para um total de 135 (48,7 %) proteínas, sendo que 43 proteínas tiveram ontologia gênica de função molecular e domínios funcionais identificados, 13 apenas função molecular e 79 apenas domínio funcional (Figura 3).

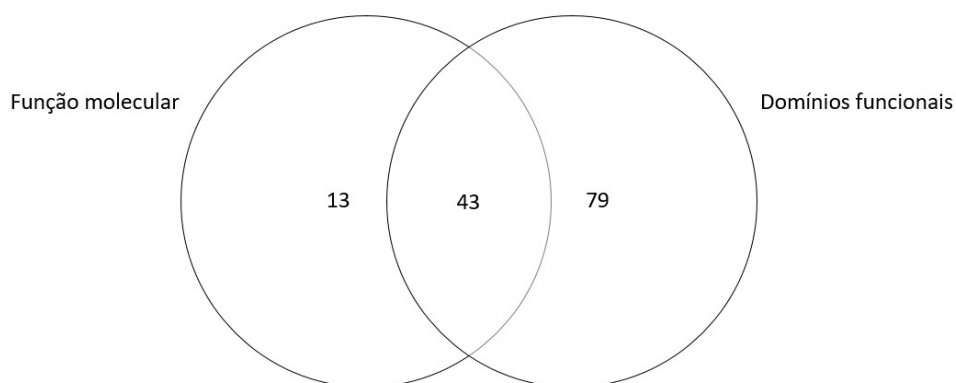


Figura 3: Número total de proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 com função predita. O número de proteínas detectadas exclusivamente em cada metodologia de predição de função ou compartilhadas entre elas são indicadas no diagrama de Venn.

4.2 Potenciais fatores de virulência

As proteínas foram consideradas como potencialmente associadas a virulência quando a análise no programa VirulentPred resultou em escore maior que zero, e além da identificação de homologia com um fator de virulência já descrito pelo programa VFDB. Assim, a proteína foi considerada um potencial fator de virulência se em ambas as ferramentas (VFDB e VirulentPred) o resultado tenha sido positivo para associação à virulência. No total das 277 proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 analisadas, 255 (92%) foram classificadas como potencialmente relacionadas a virulência (Material suplementar 4) (Figura 4).

O potencial citotóxico das proteínas aferido pelo programa DBETH resultou em 228 proteínas preditas como tóxicas, e a aferição pelo programa BTXPred resultou na predição de 3 neurotoxinas, 1 endotoxina, 1 exotoxina e 1 toxina bacteriana. O potencial alergênico das proteínas aferido pelo programa AlgPred resultou em 76 proteínas alergênicas, 150 potencialmente alergênicas e 51 não alergênicas. A busca de similaridade com genes (e seus

produtos) de resistência a antibióticos no banco de dados CARD, resultou na identificação de 245 proteínas com similaridade a proteínas de resistência a antibióticos em outras bactérias.

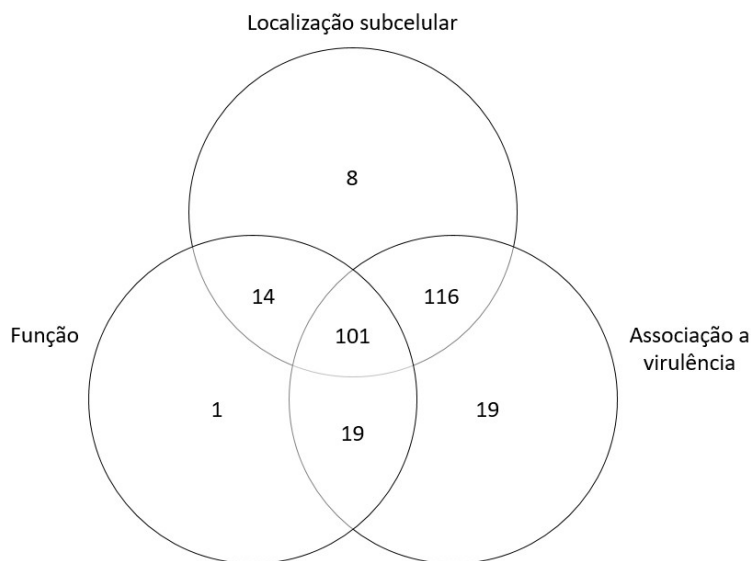


Figura 4: Números total de proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 com localização subcelular, função e/ou associação a virulência preditos. O número de proteínas com predições *in silico* de localização subcelular, função e associação a virulência indicado no diagrama de Venn.

4.3 Seleção de proteína para caracterização funcional e imunológica.

A anotação funcional *in silico* foi completa para 115 proteínas, destas, 101 foram potencialmente associadas a virulência (Material suplementar 5). Dentre estas proteínas, 10 proteínas, com função importante para a sobrevivência do *M. hyopneumoniae* e com proteínas ortóloga diferencialmente abundante entre *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare*, foram selecionadas para caracterização funcional e imunológica (Tabela 1).

Tabela 1: Proteínas de *M. hyopneumoniae* 7448 potencialmente associadas a virulência selecionadas para caracterização funcional e imunológica (proteínas-alvo).

UNIPROT	Gene	Função e/ou Domínio	Massa molecular (kDa)	Localização subcelular
Q4A7K1	<i>MHP7448_0522</i>	Lipase	229	Extracelular
		DNA Polimerase		
Q4A7U0	<i>MHP7448_0431</i>	Ligação a	47	Citoplasma

		fosfatidiletanolamina		
Q4A8L7	MHP7448_0148	Proteína de choque térmico 33	47	Citoplasma
Q4A8E9	MHP7448_0216	Domínio de Ligação a Nucleotídeos da Proteína de Ligação a Reticulócitos Py235	236	Extracelular
Q4A812	MHP7448_0356	Glutamina sintase	60	Extracelular
Q4A752	MHP7448_0675	Chaperona DNA J	102	Citoplasma
Q4A8U8	MHP7448_0064	Helicase	184	Citoplasma
Q4A7I5	MHP7448_0538	Região rica em leucina	37	Extracelular
Q4A7Q2	MHP7448_0470	Transportador ABC	69	Membrana plasmática
Q4A7B4	MHP7448_0612	Fator de virulência de ligação à imunoglobulina G	79	Extracelular

A proteína relativa a CDS Mhp7448_0148 foi escolhida para ser produzida na forma recombinante (rMhp7448_0148) dentre as proteínas selecionadas para caracterização funcional e imunológica. A Mhp7448_0148 foi escolhida por ser diferencialmente representada em comparação com sua ortóloga em *M. flocculare* e *M. hyopneumoniae* J. A proteína da CDS Mhp7448_0148 tem 411 resíduos de aminoácidos, massa molecular aproximada de 47 kDa, apresenta um domínio de proteína de choque térmico 33, sendo predita como uma proteína citoplasmática, mas que experimentalmente já foi também identificada na superfície extracelular.

4.4 Produção da proteína rMhp7448_0148

Analisando comparativamente as proteínas expressas entre as quatro linhagens, foram encontradas diferenças no rendimento da produção de rMhp7448_0148, sendo *E. coli* BL21 RP (DE3) e Star as que obtiveram maior rendimento (Figura 5). Conforme a Figura 5 evidencia, a *E. coli* BL21 Star (DE3) alcançou um maior nível de expressão da rMhp7448_0148 em relação a *E. coli* BL21 RP (DE3).

A expressão da rMhp7448 foi não diferiu entre as concentrações de IPTG utilizadas e nem entre os diferentes tempos de indução, comparando as condições de indução de uma mesma

linhagem. Desta forma, a concentração de 0,1 mM de IPTG e uma indução durante três horas foi escolhida como a mais eficiente, por apresentar rendimento igual as outras amostras, e apresentado um menor custo relativo consumo do indutor e do tempo de indução (Figura 5).

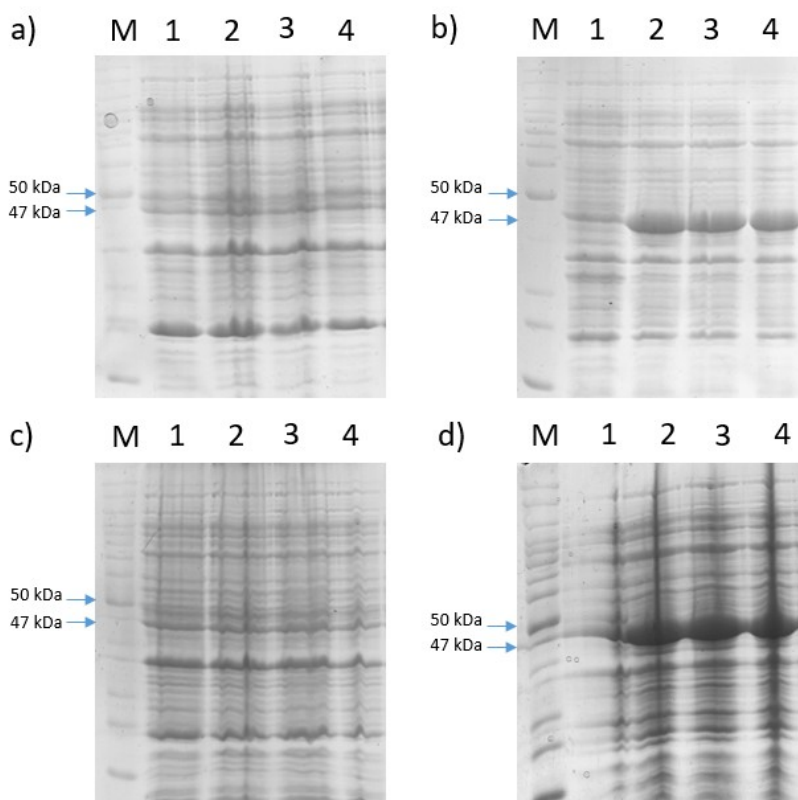


Figura 5: Expressão da rMhp7448_0148 em diferentes linhagens de *E. coli* e com diferentes tempos de indução. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com os extratos totais *E. coli* induzidas para a expressão da proteína rMhp7448_0148 à 37°C. Expressão de rMhp7448_0148 em *E. coli* BL21 pLyse (DE3) (a), *E. coli* BL21 RP (DE3) (b), *E. coli* BL21 Ril (DE3) (c) e *E. coli* BL21 Star (DE3) (d). (L) Marcador de massa molecular, (1) não induzido, (2) 0,1 mM IPTG por 3 h, (3) 0,5 mM IPTG por 3 h e (4) 1mM IPTG por 3 h.

Altos níveis de expressão da proteína recombinante em *E. coli* frequentemente resultam em agregação das proteínas expressas em corpos de inclusão, tornando a proteína insolúvel. A maior porção proteica permanece na porção insolúvel por causa da provável formação de corpos de inclusão devido à grande produção. A fim de aumentar a solubilidade da proteína recombinante foram testadas duas temperaturas: 37°C e 28°C de indução, sendo que a 28°C a

proteína apresentou maior quantidade na fração solúvel. A proteína recombinante foi solubilizada a partir de corpos de inclusão com desnaturação da enzima. A purificação da rMhp7448_0148 expressa em *E. coli* BL21 Star (DE3) foi realizada com a fração solúvel, pois esta linhagem apresentou uma maior quantidade da proteína recombinante na fração solúvel em relação as outras linhagens (Figura 6).

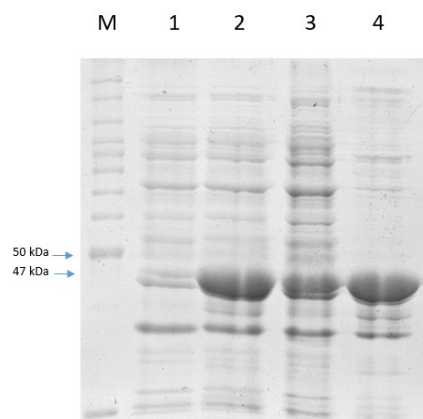


Figura 6: Avaliação de solubilidade da rMhp7448_0148. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com marcador de massa molecular (M), com o extrato celular com expressão a 37°C da rMhp7448_0148 não induzida (1), com extrato celular com expressão da rMhp7448_0148 induzida (2), com fração solúvel (solubilizada com sarcosil) do extrato celular com expressão da rMhp7448_0148 induzida (3) e fração insolúvel (4).

A rMhp7448_0148 se mostrou ainda predominantemente insolúvel (Figura 6). A solubilização da proteína apresentou uma maior quantidade na fração solúvel utilizando ureia e hidrocloreto de guanidina. A fim de aumentar a solubilização a temperatura de indução da proteína recombinante foi realizada a 28°C.

A purificação da proteína recombinante foi então realizada a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, utilizando ureia para solubilização e lavagens com hidrocloreto de guanidina. Visto que, nas condições-padrão utilizadas inicialmente a rMhp7448_0148 permanecia ligada à resina cromatográfica, a sua eluição foi realizada com PBS-SDS 1% submetida a 100°C por 1 min. Com isso, foram obtidas 0,2 mg da rMhp7448_0148 na forma pura a partir de 100 ml de cultivo (Figura 7).

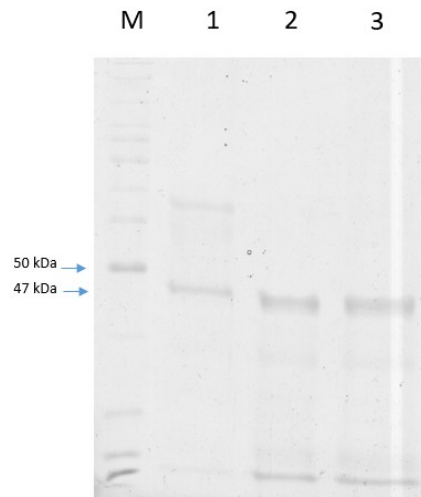


Figura 7: Avaliação da purificação da rMhp7448_0148. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% com marcador de massa molecular (M), primeira eluição (1), segunda eluição (2) e terceira eluição (3) com PBS 1X SDS 0,1% a 100°C por 1 min.

5. DISCUSSÃO

O genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 contém 695 genes, dos quais 418 codificam proteínas anotadas como de função conhecida e 277 proteínas não caracterizadas e/ou hipotéticas (Vasconcelos, A. *et al.*, 2005). Interessantemente, a proporção de genes codificadores de proteínas de função desconhecida (~40% do genoma) se mantém em outras linhagens de *M. hyopneumoniae* e em outros micoplasmas do trato respiratório suíno, como *M. flocculare* e *M. hyorhinis* (Siqueira *et al.*, 2013). A anotação funcional do repertório de proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* é necessária para completar a informação biológica dos dados genômicos e proteômicos disponíveis, incluindo a identificação de proteínas com função relevante para a patogenicidade e virulência da bactéria. Neste contexto, este estudo utilizou uma abordagem *in silico* para realizar a anotação funcional, incluído a predição de associação a virulência, do repertório de proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae*.

A anotação funcional das proteínas de função desconhecida de *M. hyopneumoniae* foi obtida utilizando diferentes ferramentas de bioinformática já validadas para *Mycoplasma pneumoniae* (Shahbaaz *et al.*, 2015). Estas análises incluíram a predição de localização subcelular e de funções moleculares baseadas em GO e identificação de domínios funcionais. O uso de ferramentas comparativas baseadas em alinhamentos como o BLAST2GO e HMMER são frequentemente utilizadas em análises funcionais de produtos gênicos através do reconhecimento de sequências homólogas relacionadas em diferentes bancos de dados (Conesa *et al.*, 2005). Além disso, a predição de domínios e motivos proteicos funcionais é considerada a base para a identificação do papel das proteínas de função desconhecida em diferentes processos biológicos. Potenciais fatores de virulência também foram preditos utilizando diferentes softwares que utilizam de bancos de dados de fatores de virulência bacterianos.

Os dados obtidos a partir dos diferentes softwares e bancos de dados utilizados para a anotação funcional foram concatenados para garantir a acurácia das predições. A anotação funcional foi considerada completa quando a localização subcelular e a função molecular, seja por GO ou por predição de domínios funcionais, foram preditas. Assim, 115 (41%) das 277 proteínas anotadas previamente como de função desconhecida foram anotadas funcionalmente com sucesso.

Considerando os dados de localização subcelular, 239 (86,28%) proteínas foram classificadas como localizadas no citoplasma, na superfície ou na fração extracelular de *M. hyopneumoniae*. Entretanto, 38 proteínas não tiveram localização subcelular típica definida, uma vez que houve divergência da localização subcelular indicada entre os programas de predição, e também pela incapacidade de discriminação a partir dos programas de predição de domínios transmembrana. Uma única localização subcelular foi definida para cada uma das proteínas, porém estudos de proteômica já identificaram proteínas em mais de um compartimento subcelular (Paes *et al.*, 2018), indicando que estas proteínas podem ser transportadas dentro da célula. Neste contexto, a predição de localização subcelular permite inferir apenas a localização subcelular típica das proteínas e não os diferentes compartimentos na qual elas podem ser encontradas. A predição de domínios transmembrana auxiliou na predição da localização subcelular típica, por diferenciar proteínas citoplasmáticas das de membrana citoplasmática. As proteínas da membrana citoplasmática e extracelulares chegaram a compor mais da metade das proteínas (55,23%). Foi demonstrado que algumas proteínas típicas do citoplasma também participam ativamente de processos biológicos no ambiente extracelular. Isso não implica que a função no ambiente extracelular seja idêntica à do ambiente citoplasmático, sendo tais proteínas multifuncionais (proteínas com função alternativa, do inglês *moonlighting protein*), exibindo funções tipicamente não atribuídas a elas (Khan *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Wang and Jeffery, 2016). Algumas proteínas com funções alternativas já foram caracterizadas em micoplasmas, incluindo *M. hyopneumoniae* (Gründel *et al.*, 2015; Widjaja *et al.*, 2017).

A função foi predita para 135 proteínas, outrora de função desconhecida. Esse complemento da anotação aumentou a cobertura de genes codificadores de proteínas com função conhecida no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 de 60% para 80%. A combinação de duas diferentes abordagens na predição de função das proteínas (predição de função molecular e de domínios funcionais) foi de fundamental importância para expandir o número de proteínas com função predita, assim como para aumentar a confiabilidade dos dados. As proteínas foram associadas há uma diversidade de funções e podem ser divididas em enzimas, proteínas de transporte e reguladores da expressão gênica, as quais podem estar associadas a processos metabólicos basais e patogenicidade de *M. hyopneumoniae* 7448. Entretanto, 142 proteínas ainda permanecem sem função predita, de maneira que a utilização de programas de análises de

interações entre proteínas pode aumentar as proteínas com anotação funcional (Shahbaaz *et al.*, 2015).

As enzimas identificadas foram associadas as classes de hidrolases, oxidoreduções, liases, isomerases, ligases e transferases. As enzimas de *M. hyopneumoniae* participam de processos fundamentais tanto para a sobrevivência, quanto para colonização e patogenicidade (Ferrarini *et al.*, 2016; Galvao Ferrarini *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2018).

As hidrolases identificadas como nucleases (endonucleases, exonucleases) podem contribuir para sobrevivência e multiplicação por facilitarem a formação e manutenção de biofilmes (Kiedrowski *et al.*, 2011), a evasão de armadilhas extracelulares de neutrófilos (Berends *et al.*, 2010), na aquisição de nutrientes a partir de ácidos nucleicos (Pinchuk *et al.*, 2008) e modularem a agregação celular (Tan *et al.*, 2019). Interessantemente, já foi demonstrado que *M. hyopneumoniae* é capaz de formar biofilmes e escapar de armadilhas extracelulares de macrófagos (Henthorn *et al.*, 2018; Raymond *et al.*, 2018), que são processos importantes para a patogenicidade e virulência da bactéria. No entanto, as proteínas envolvidas nestes processos ainda não foram identificadas. Assim, a anotação de proteínas potencialmente envolvidas nestes processos pode contribuir para a caracterização de mecanismos moleculares que determinam a patogenicidade de *M. hyopneumoniae*.

As hidrolases identificadas como peptidases (serina peptidases, metaloproteinases) podem atuar no processamento pós-traducional de proteínas de superfície (Moitinho-Silva *et al.*, 2013; Tacchi *et al.*, 2016; Berry *et al.*, 2017), na aquisição de nutrientes (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996), na homeostase celular, na destruição de peptídeos efetores imunológicos de hospedeiros (Potempa and Pike, 2009), além de desenvolverem funções não típicas (*moonlighting*) (Robinson *et al.*, 2013; Jarocki *et al.*, 2015), conforme já descrito para aminopeptidases em *M. hyopneumoniae*.

As hidrolases identificadas como esterases podem contribuir na formação de biofilme e na regulação de respostas adaptativas (Diethmaier *et al.*, 2014). As hidrolases identificadas como cinases (riboflavina cinase) podem estar envolvidas na síntese de flavina mononucleotídeo e flavina adenina dinucleotídeo, sendo importante para o metabolismo energético e para a manutenção do equilíbrio de oxirredução (Cimerman *et al.*, 2006). As hidrolases identificadas como lactamases podem estar envolvidas em processos de resistência a antibióticos lactâmicos,

porém naturalmente *M. hyopneumoniae* não é suscetível a antibióticos lactâmicos, sugerindo que essa proteína possa desempenhar outras funções na célula ou tenha permanecido como um artefato da história evolutiva, ou ainda tenha sido integrada ao genoma a partir de transferência horizontal (Sirand-Pugnet *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014; Chernov *et al.*, 2018). As hidrolases identificadas como helicases podem atuar em quase todos os aspectos do metabolismo dos ácidos nucleicos, como reparo do DNA e replicação de plasmídeos específicos (Estevão *et al.*, 2013).

As oxirredutases identificadas (álcool desidrogenases e proteínas de choque térmico) podem contribuir para a manutenção do equilíbrio de oxirredução da bactéria e na redução do estresse oxidativo de *M. hyopneumoniae* (Machado *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2019). As oxirredutases podem estar associadas a virulência por serem importantes para a sobrevivência de *M. hyopneumoniae* devido a produção de espécies reativas de oxigênio pelo próprio micoplasma (endógeno), quanto pela produção do hospedeiro (exógeno) (Vilei and Frey, 2001; Schafer *et al.*, 2007; Deblanc *et al.*, 2013; Ferrarini *et al.*, 2016). Interessantemente, várias proteínas de relacionadas a manutenção do equilíbrio de oxirredução foram mais abundantes em *M. hyopneumoniae* 7448 em comparação a *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare* (Paes *et al.*, 2018; Paes *et al.*, 2019).

As liases, isomerases e ligases identificadas podem desempenhar uma diversidade de funções em *M. hyopneumoniae*. Dentre as proteínas foram encontradas proteínas que podem atuar na síntese de ácidos ribonucleicos (RNA), metabolismo de glicerol, síntese de componentes da membrana plasmática e na resistência a antimicrobianos (Staubitz *et al.*, 2004).

As transferases identificadas (DNA-polimerases, RNA-polimerases, metiltransferases e fosfotransferase) podem atuar na síntese de RNA e DNA, e na metilação do DNA. De maneira que contribuem na manutenção e regulação da transcrição gênica, tradução de RNA e nos níveis de expressão de proteínas. As transferases identificadas como fosfotransferases, as quais catalisam a fosforilação de açúcares, também podem atuar no metabolismo da glicose, regulando a homeostase de glicose em *M. hyopneumoniae* (Halbedel *et al.*, 2004).

Além das enzimas com capacidade de regular a expressão gênica, também foi identificada proteína reguladora do término da transcrição: a proteína Rho, até então não anotada no genoma de *M. hyopneumoniae*. A identificação desta proteína em *M. hyopneumoniae* é interessante do ponto de vista da regulação do término da transcrição, uma vez que este micoplasma apresenta

terminadores transcricionais intrínsecos atípicos (Fritsch *et al.*, 2015). Curiosamente foram encontradas proteínas relacionadas a tradução diferencialmente representadas em *M. hyopneumoniae* 7448 em comparação a *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare* em condições de estresse oxidativo e condições de controle (Paes *et al.*, 2019). A tradução incorreta tem sido demonstrada como uma estratégia bacteriana para superar a morte celular causada pelo estresse oxidativo e, como a tradução incorreta é comum em micoplasmas, a sobre-representação de proteínas relacionadas à tradução após a exposição ao peróxido de hidrogênio é sugestiva de seu envolvimento em mecanismos que resistem ao estresse oxidativo.

Os transportadores identificados (transportadores ABC, transportadores MFS, pré-proteína translocase SecG e proteína extrusora de toxinas) atuam no transporte de íons, peptídeos e açúcares. Os transportadores de membrana desempenham um importante via no metabolismo da célula, importantes para a sobrevivência e colonização de *M. hyopneumoniae*, sendo indicados como potenciais fatores de virulência em *M. hyopneumoniae* (Paes *et al.*, 2017; Paes *et al.*, 2019). Os transportadores de membrana são fundamentais para a formação de biofilme, na virulência e na resistência a antimicrobianos (Garmory and Titball, 2004; Kim *et al.*, 2009). As proteínas com função de transporte de membrana têm abundância diferencial em relação as suas ortólogas em *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*, sendo sobre-representadas na bactéria patogênica (Paes *et al.*, 2018).

A predição de associação a virulência foi realizada para todas as 277 proteínas, destas, 255 (92%) proteínas foram associadas a virulência pelos programas VirulentPred e VFDB. A predição de citotoxicidade, alergenicidade e similaridade com proteínas de resistência a antibióticos não foram utilizadas para determinação de associação a virulência, mas forneceram informações complementares que ajudaram a elucidar as possíveis funções e associações das proteínas de *M. hyopneumoniae*. A fim de melhorar a predição de associação a virulência e deixar ela mais acurada seria indicado a utilização da referência de escores de proteínas já consideradas patogênicas em *M. hyopneumoniae*, para calibrar os programas e evitar falsos positivos, visto que a patogenicidade de micoplasma não é causada por toxinas bacterianas clássicas (Shahbaaz *et al.*, 2015).

Os dados de anotação funcional e predição de associação à virulência foram utilizados para selecionar uma proteína de *M. hyopneumoniae* previamente considerada de função

desconhecida para ensaios de caracterização funcional e imunológica. Os critérios para a seleção foram (i) anotação funcional; (ii) predição de associação a virulência; a (iii) abundância diferencial em relação a proteínas ortólogas de *M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*. A partir de todas as predições das proteínas, o primeiro critério de seleção diminuiu a um conjunto de 115 proteínas anotadas funcionalmente com predição de localização subcelular e função, o segundo critério restringiu essas proteínas a um conjunto de 101 proteínas também associadas a virulência, e o terceiro critério foi o que eliminou a maioria das proteínas, visto que a maioria (91 proteínas) não apresentavam expressão diferencial entre *M. hyopneumoniae* 7448 e suas contrapartes não patogênicas (*M. hyopneumoniae* J e *M. flocculare*)

A seleção inicial das proteínas-alvo para caracterização funcional e imunológica resultou em 10 proteínas, as quais apresentam diferentes funções, desde enzimas envolvidas na replicação e oxirredução, assim como proteínas envolvidas com transporte transmembrana, e proteínas com ortologia a proteínas classificadas como fatores de virulência com outras bactérias. As proteínas-alvo apresentaram funções relacionadas por Paes *et al.* (2018) a virulência, como proteínas envolvidas no transporte transmembrana e proteínas que atuam na manutenção do equilíbrio de oxirredução.

A proteína codificada por Mhp7448_0148 foi escolhida dentre as proteínas-alvo selecionadas, para ser caracterizada funcional e imunologicamente no presente estudo. A proteína foi predita com domínio funcional de uma proteína de choque térmico de 33 kDa, a qual está relacionada a manutenção do equilíbrio de oxirredução. Esta proteína foi escolhida por ser sobre-representada em *M. hyopneumoniae* em relação à sua ortóloga de *M. flocculare*, além de ter sido exclusivamente identificada nos repertórios proteicos de *M. hyopneumoniae* 7448 em comparação *M. hyopneumoniae* J, em condições de estresse oxidativo e térmico (Paes *et al.*, 2018; Paes *et al.*, 2019). Estes resultados sugerem que essa proteína atua na proteção de *M. hyopneumoniae* 7448 em situações de estresse, contribuindo para a sobrevivência da bactéria e para o estabelecimento da infecção no hospedeiro suíno.

Para a realização dos ensaios de caracterização funcional e imunológica, a proteína Mhp7448_0148 foi produzida na versão recombinante em *E. coli*. A proteína rMhp7448_0148 apresentou o mesmo nível de expressão em todos os tempos de indução e concentrações de IPTG testados. Desta maneira, o tempo escolhido para a expressão da rMhp7448_0148 foi o menor

tempo (3 h) de indução e a menor concentração de IPTG (0,1 mM) testada. A expressão em *E. coli* BL21 Star (DE3) obteve maior rendimento da rMhp7448_0148 em relação aos cultivos de *E. coli* BL21 pLysE, *E. coli* BL21 códon Plus RP, e *E. coli* BL21 códon Plus Ril. Assim, expressão mais eficiente da rMhp7448_0148 foi realizada em *E. coli* BL21 Star (DE3) com 0,1 mM de IPTG por 3 h.

Apesar das condições de expressão apresentarem um bom rendimento, a maior quantidade da proteína ficou na fração insolúvel, indicando que a rMhp7448_0148 é insolúvel nas condições de expressão testadas. Por isso, diferentes protocolos de solubilização da proteína foram testados. A adição de detergentes para solubilização se mostrou eficiente para solubilização da proteína, mas impediu a obtenção da proteína recombinante na forma purificada. A rMhp7448 apresentou uma forte aderência à resina utilizada para a cromatografia de afinidade, mesmo em altas concentrações de imidazol (100 mM – 500 mM), impedindo o processo de purificação. Como alternativa a temperatura de indução foi diminuída da 28°C, a fim de evitar a insolubilidade da rMhp7448_0148 pela formação de agregados devido aos altos níveis de expressão da rMhp7448_0148 (Rosano and Ceccarelli, 2014). A solubilização da rMhp7448_0148 foi realizada com ureia e hidrocloreto de guanidina (Singh *et al.*, 2015). A solubilização com ureia e hidrocloreto de guanidina apresentou um maior rendimento da rMhp7448_0148 em relação a solubilização com sarcosil. Porém a desvantagem da solubilização com ureia e hidrocloreto é que esses agentes desnaturam a proteína. O processo de renaturação da rMhp7448_0148 foi realizado utilizando gradientes com concentrações decrescentes de ureia. Entretanto, a proteína não pode ser purificada na condição nativa devido à forte aderência com a resina. A purificação da proteína só pode ser realizada em condições desnaturantes, como o uso de tampão PBS 1X contendo 0,1% SDS e eluição à 100°C por 1 min. Nestas condições, o rendimento da rMhp7448_0148 purificada foi de 0,2 mg a partir de 100 ml de cultivo.

A rMhp7448_0148 foi produzida em *E. coli* e purificada na forma desnaturada. A rMhp7448_0148 desnaturada pode ser usada para a realização de ensaios de caracterização imunológica, mas não pode ser caracterizada funcionalmente. Por isso, a proteína desnaturada será inicialmente utilizada para ensaios de caracterização imunológica. Os ensaios funcionais poderão ser realizados a partir da padronização da produção e purificação da rMhp7448_0148 na forma nativa. Como perspectivas do presente estudo se elenca a produção da rMhp7448_0148 na

forma nativa para a realização de ensaios funcionais. Além da proteína escolhida para a produção no presente estudo, ainda permanecem 9 proteínas-alvo selecionadas para a sua caracterização funcional e imunológica. Ainda 20% das proteínas codificadas no genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 permanecem sem função predita, de maneira que novas análises *in silico* são necessárias para a identificação e descrição de novos potenciais determinantes de patogenicidade.

6. PERSPECTIVAS

As perspectivas do presente estudo são a anotação funcional das CDSs ainda anotadas como de função desconhecida no genoma de *M. hyopneumoniae*, e a caracterização imunológica e funcional da rMhp7448_0148. A anotação funcional das CDSs de função desconhecida do genoma de *M. hyopneumoniae* 7448 é ainda necessária, visto que apesar dos esforços do presente estudo, cerca de 20% das CDSs continuam sem anotação funcional. Para tanto será realizado o refinamento das análises e novas estratégias de predição serão utilizadas. A caracterização imunológica da rMhp7448_0148 será realizada por ensaios para avaliação da imunogenicidade e antigenicidade, os quais podem ser realizados com a proteína na forma desnaturada. A imunogenicidade será avaliada a partir da resposta humoral e celular induzida em camundongos, e a antigenicidade com soros de suínos infectados com *M. hyopneumoniae*. Visto que a rMhp7448_0148 foi produzida na forma desnaturada, é necessário a produção da proteína na forma nativa, para realização dos ensaios funcionais para avaliação da possível atividade de chaperona.

7. REFERÊNCIAS

BENDTSEN, J. D. et al. Non-classical protein secretion in bacteria. **BMC Microbiol**, v. 5, p. 58, Oct 2005. ISSN 1471-2180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212653> >.

BERENDS, E. T. et al. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **J Innate Immun**, v. 2, n. 6, p. 576-86, 2010. ISSN 1662-8128. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829609> >.

BERRY, I. J. et al. N-terminomics identifies widespread endoproteolysis and novel methionine excision in a genome-reduced bacterial pathogen. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 11063, 09 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28894154> >.

BHASIN, M.; GARG, A.; RAGHAVA, G. P. PSLpred: prediction of subcellular localization of bacterial proteins. **Bioinformatics**, v. 21, n. 10, p. 2522-4, May 2005. ISSN 1367-4803. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699023> >.

BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. GPCRpred: an SVM-based method for prediction of families and subfamilies of G-protein coupled receptors. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Web Server issue, p. W383-9, Jul 2004. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215416> >.

CHAKRABORTY, A. et al. DBETH: a Database of Bacterial Exotoxins for Human. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D615-20, Jan 2012. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102573> >.

CHEN, L. et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Database issue, p. D325-8, Jan 2005. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608208> >.

CHERNOV, V. M. et al. Antimicrobial resistance in mollicutes: known and newly emerging mechanisms. **FEMS Microbiol Lett**, v. 365, n. 18, 09 2018. ISSN 1574-6968. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30052940> >.

CIMERMAN, A.; ARNAUD, G.; FOISSAC, X. Stolbur phytoplasma genome survey achieved using a suppression subtractive hybridization approach with high specificity. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 5, p. 3274-83, May 2006. ISSN 0099-2240. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672467> >.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-6, Sep 2005. ISSN 1367-4803. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081474> >.

DE CASTRO, L. A. et al. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in Mycoplasma hyopneumoniae strains. **Vet Microbiol**, v. 116, n. 4, p. 258-69, Sep 2006. ISSN 0378-1135. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730926> >.

DEBLANC, C. et al. Pre-infection of pigs with Mycoplasma hyopneumoniae induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. **Vet Microbiol**, v. 162, n. 2-4, p. 643-51, Mar 2013. ISSN 1873-2542. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266108> >.

DIETHMAIER, C. et al. The YmdB phosphodiesterase is a global regulator of late adaptive responses in Bacillus subtilis. **J Bacteriol**, v. 196, n. 2, p. 265-75, Jan 2014. ISSN 1098-5530. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24163345> >.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nat Protoc**, v. 2, n. 4, p. 953-71, 2007. ISSN 1750-2799. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446895> >.

ESTEVIÃO, S. et al. Functional analysis of the superfamily 1 DNA helicases encoded by Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70870, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894687> >.

FADIEL, A. et al. Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. **Front Biosci**, v. 12, p. 2020-8, Jan 2007. ISSN 1093-9946. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17127440> >.

FERRARINI, M. G. et al. Insights on the virulence of swine respiratory tract mycoplasmas through genome-scale metabolic modeling. **BMC Genomics**, v. 17, p. 353, 05 2016. ISSN 1471-2164. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27178561> >.

FRITSCH, T. E.; SIQUEIRA, F. M.; SCHRANK, I. S. Intrinsic terminators in Mycoplasma hyopneumoniae transcription. **BMC Genomics**, v. 16, p. 273, Apr 2015. ISSN 1471-2164. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25886614> >.

GALVAO FERRARINI, M. et al. Hydrogen peroxide production and myo-inositol metabolism as important traits for virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Mol Microbiol**, v. 108, n. 6, p. 683-696, 06 2018. ISSN 1365-2958. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29624763> >.

GARG, A.; GUPTA, D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 62, Jan 2008. ISSN 1471-2105. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226234> >.

GARMORY, H. S.; TITBALL, R. W. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. **Infect Immun**, v. 72, n. 12, p. 6757-63, Dec 2004. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557595> >.

GEER, L. Y. et al. CDART: protein homology by domain architecture. **Genome Res**, v. 12, n. 10, p. 1619-23, Oct 2002. ISSN 1088-9051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368255> >.

GOLDBERG, T. et al. LocTree3 prediction of localization. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W350-5, Jul 2014. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24848019> >.

GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOY, J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 319-44, Jul 1996. ISSN 0168-6445. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703509> >.

GOUGH, J. et al. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **J Mol Biol**, v. 313, n. 4, p. 903-19, Nov 2001. ISSN 0022-2836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11697912> >.

GRÜNDEL, A. et al. Network of Surface-Displayed Glycolytic Enzymes in *Mycoplasma pneumoniae* and Their Interactions with Human Plasminogen. **Infect Immun**, v. 84, n. 3, p. 666-76, 2015. ISSN 1098-5522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667841> >.

HALBEDEL, S.; HAMES, C.; STÜLKE, J. In vivo activity of enzymatic and regulatory components of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Mycoplasma pneumoniae*. **J Bacteriol**, v. 186, n. 23, p. 7936-43, Dec 2004. ISSN 0021-9193. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547265> >.

HAN, J. et al. Complete Genome Sequence of. **Genome Announc**, v. 5, n. 38, Sep 2017. ISSN 2169-8287. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28935747> >.

HENTHORN, C. R.; CHRIS MINION, F.; SAHIN, O. Utilization of macrophage extracellular trap nucleotides by Mycoplasma hyopneumoniae. **Microbiology**, v. 164, n. 11, p. 1394-1404, 11 2018. ISSN 1465-2080. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30383520> >.

JAROCKI, V. M. et al. MHJ_0461 is a multifunctional leucine aminopeptidase on the surface of Mycoplasma hyopneumoniae. **Open Biol**, v. 5, n. 1, p. 140175, Jan 2015. ISSN 2046-2441. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589579> >.

KHAN, I. et al. Genome-scale identification and characterization of moonlighting proteins. **Biol Direct**, v. 9, p. 30, Dec 2014. ISSN 1745-6150. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25497125> >.

KIEDROWSKI, M. R. et al. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26714, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22096493> >.

KIM, Y. et al. Toxin-antitoxin systems in Escherichia coli influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. **J Bacteriol**, v. 191, n. 4, p. 1258-67, Feb 2009. ISSN 1098-5530. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060153> >.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **J Mol Biol**, v. 305, n. 3, p. 567-80, Jan 2001. ISSN 0022-2836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152613> >.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. Web Server issue, p. W429-32, Jul 2007. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483518> >.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D302-5, Jan 2012. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053084> >.

MACHADO, C. X. et al. A peroxiredoxin from Mycoplasma hyopneumoniae with a possible role in H₂O₂ detoxification. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 10, p. 3411-9, Oct 2009. ISSN 1350-0872. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589831> >.

MAES, D. et al. Update on Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. **Transbound Emerg Dis**, v. 65 Suppl 1, p. 110-124, May 2018. ISSN 1865-1682. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834294> >.

MATTHIJS, A. M. F. et al. Systems Immunology Characterization of Novel Vaccine Formulations for. **Front Immunol**, v. 10, p. 1087, 2019. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31178860> >.

MOITINHO-SILVA, L. et al. Mycoplasma hyopneumoniae in vitro peptidase activities: identification and cleavage of kallikrein-kinin system-like substrates. **Vet Microbiol**, v. 163, n. 3-4, p. 264-73, May 2013. ISSN 1873-2542. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23421966> >.

ORENGO, C. A. et al. CATH--a hierarchic classification of protein domain structures. **Structure**, v. 5, n. 8, p. 1093-108, Aug 1997. ISSN 0969-2126. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9309224> >.

PAES, J. A. et al. Differential responses to stress of two Mycoplasma hyopneumoniae strains. **J Proteomics**, v. 199, p. 67-76, May 2019. ISSN 1876-7737. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30862566> >.

_____. Secretomes of Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare reveal differences associated to pathogenesis. **J Proteomics**, v. 154, p. 69-77, 02 2017. ISSN 1876-7737. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28003119> >.

_____. Comparative proteomics of two Mycoplasma hyopneumoniae strains and Mycoplasma flocculare identified potential porcine enzootic pneumonia determinants. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1230-1246, 2018. ISSN 2150-5608. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30027802> >.

PINCHUK, G. E. et al. Utilization of DNA as a sole source of phosphorus, carbon, and energy by Shewanella spp.: ecological and physiological implications for dissimilatory metal reduction. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 4, p. 1198-208, Feb 2008. ISSN 1098-5336. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156329> >.

PINTO, P. M. et al. Proteomic survey of the pathogenic Mycoplasma hyopneumoniae strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. **Vet Microbiol**, v. 121, n. 1-2, p. 83-93, Mar 2007. ISSN 0378-1135. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182197> >.

POTEMPA, J.; PIKE, R. N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. **J Innate Immun**, v. 1, n. 2, p. 70-87, 2009. ISSN 1662-8128. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756242> >.

RAYMOND, B. B. A. et al. Extracellular DNA release from the genome-reduced pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae* is essential for biofilm formation on abiotic surfaces. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 10373, Jul 2018. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29991767> >.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 4, p. 1094-156, Dec 1998. ISSN 1092-2172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841667> >.

REOLON, L. A. et al. Survey of surface proteins from the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 using a biotin cell surface labeling approach. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112596, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386928> >.

ROBINSON, M. W. et al. MHJ_0125 is an M42 glutamyl aminopeptidase that moonlights as a multifunctional adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Open Biol**, v. 3, n. 4, p. 130017, Apr 2013. ISSN 2046-2441. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594879> >.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol**, v. 5, p. 172, 2014. ISSN 1664-302X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860555> >.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Web Server issue, p. W202-9, Jul 2006. ISSN 1362-4962. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16844994> >.

_____. BTXpred: prediction of bacterial toxins. **In Silico Biol**, v. 7, n. 4-5, p. 405-12, 2007. ISSN 1386-6338. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391233> >.

SCHAFER, E. R. et al. Global transcriptional analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 11, p. 3785-90, Nov 2007. ISSN 1350-0872. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975087> >.

SHAHBAAZ, M. et al. In silico approaches for the identification of virulence candidates amongst hypothetical proteins of *Mycoplasma pneumoniae* 309. **Comput Biol Chem**, v. 59 Pt A, p. 67-80, Dec 2015. ISSN 1476-928X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26414949> >.

SIMIONATTO, S. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. **Vet Microbiol**, v. 165, n. 3-4, p. 234-42, Aug 2013. ISSN 1873-2542. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680109> >.

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 41, Mar 2015. ISSN 1475-2859. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889252> >.

SIQUEIRA, F. M. et al. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **BMC Genomics**, v. 14, p. 175, Mar 2013. ISSN 1471-2164. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23497205> >.

SIRAND-PUGNET, P. et al. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. **Res Microbiol**, v. 158, n. 10, p. 754-66, Dec 2007. ISSN 0923-2508. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18023150> >.

STAUBITZ, P. et al. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. **FEMS Microbiol Lett**, v. 231, n. 1, p. 67-71, Feb 2004. ISSN 0378-1097. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769468> >.

TACCHI, J. L. et al. Post-translational processing targets functionally diverse proteins in *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Open Biol**, v. 6, n. 2, p. 150210, Feb 2016. ISSN 2046-2441. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865024> >.

TAN, A. et al. *Moraxella catarrhalis* NucM is an entry nuclease involved in extracellular DNA and RNA degradation, cell competence and biofilm scaffolding. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 2579, Feb 2019. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30796312> >.

TAO, Y. et al. A concise review of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Res Vet Sci**, v. 123, p. 144-152, Apr 2019. ISSN 1532-2661. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30665029> >.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 849-50, Sep 2001. ISSN 1367-4803. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590105> >.

VASCONCELOS, A. T. et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **J Bacteriol**, v. 187, n. 16, p. 5568-77, Aug 2005. ISSN 0021-9193. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16077101> >.

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**, v. 8, n. 1, p. 85-92, Jan 2001. ISSN 1071-412X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139200> >.

WANG, G. et al. The Roles of Moonlighting Proteins in Bacteria. **Curr Issues Mol Biol**, v. 16, p. 15-22, 2014. ISSN 1467-3045. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872606> >.

WANG, W.; JEFFERY, C. J. An analysis of surface proteomics results reveals novel candidates for intracellular/surface moonlighting proteins in bacteria. **Mol Biosyst**, v. 12, n. 5, p. 1420-31, 04 2016. ISSN 1742-2051. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26938107> >.

WIDJAJA, M. et al. Elongation factor Tu is a multifunctional and processed moonlighting protein. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 11227, Sep 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28894125> >.

WOLF, M. et al. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 3, p. 871-5, May 2004. ISSN 1466-5026. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143038> >.

YU, N. Y. et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 13, p. 1608-15, Jul 2010. ISSN 1367-4811. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472543> >.

YU, Y. et al. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase encoded by a core gene of *Mycoplasma hyopneumoniae* contributes to host cell adhesion. **Vet Res**, v. 49, n. 1, p. 114, Nov 2018. ISSN 1297-9716. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30454073> >.