

NEWTON MORENO SANCHES

**ANÁLISE *IN SILICO* E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE RNAs PEQUENOS REGULADORES: ALVOS E
FENÓTIPOS ENVOLVIDOS EM *Actinobacillus
pleuropneumoniae***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S211a
2018 Sanches, Newton Moreno, 1967-
Análise *in silico* e caracterização funcional de RNAs
pequenos reguladores : alvos e fenótipos envolvidos em
Actinobacillus pleuropneumoniae / Newton Moreno Sanches. –
Viçosa, MG, 2018.
xiv, 144 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Denise Mara Soares Bazzolli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 131-140.

1. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 2. Pasteurellaceae.
3. RNA. 4. Virulência (Microbiologia). 5. Bioinformática.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

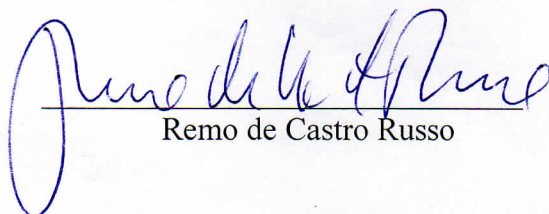
CDD 22. ed. 579.33

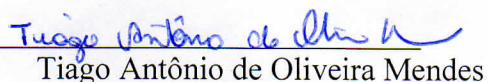
NEWTON MORENO SANCHES

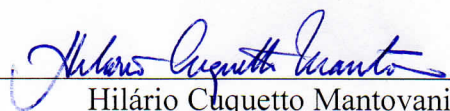
**ANÁLISE *IN SILICO* E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL
DE RNAs PEQUENOS REGULADORES: ALVOS E
FENÓTIPOS ENVOLVIDOS EM *Actinobacillus
pleuropneumoniae***

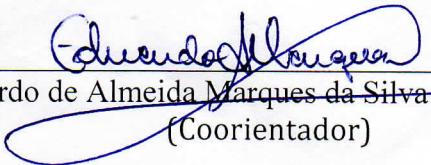
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

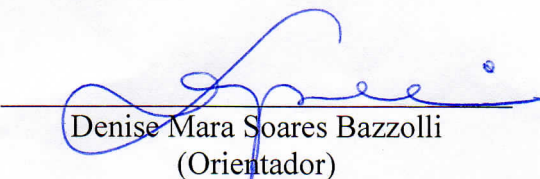
APROVADA: 06 de setembro de 2018.


Remo de Castro Russo


Tiago Antônio de Oliveira Mendes


Hilário Cuquetto Mantovani


Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Coorientador)


Denise Mara Soares Bazzolli
(Orientador)

*Para meu pai
in memoriam*

*Cum sit enim proprium viro sapienti
supra petra ponere sedem fundamenti,
stultus ego comparor fluvio labenti,
sub eodem tramite nunquam permanenti.*

*Feror ego veluti sine nauta navis.
ut per vias aeris vaga fertus avis;
non me tenent vincula, non me tenet clavis,
quero mihi similes, ed adiungor pravis.*

Carl Orff - *Estuans interius*
(Canções da Beuern, 1936)

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Campus Florestal, que me liberou para meu treinamento.
- Ao Departamento de Microbiologia e Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela acolhida.
- Às agências de fomento FAPEMIG, CAPES, CNPq e BBSRC (Reino Unido), que financiaram a pesquisa aqui apresentada.
- Aos membros da banca, que me proporcionaram um salutar momento de aprendizagem.

MUITO OBRIGADO!

Esta tese é antes de tudo um ato contínuo de empatia. Mais do que a academia, mais que o conhecimento, muito mais do que qualquer título. Cada letra digitada, cada palavra montada, cada resultado alcançado, só o foi porque alguém colaborou com seu sentimento, sua preocupação.

Atos rotineiros, como o bom dia sincero do Sr Paulo da portaria ao nos receber, o café com sorriso da Elizete ou da Jaqueline, o bate papo sempre produtivo com a Camila, a bronca do Danilo e da Emília pelo reagente não devolvido, a nobreza do Sr Paulo em auxiliar com os materiais ou a ternura e paciência da Sueli ao cobrar o relatório fora do prazo. Cada ato, uma leveza a mais no dia. Uma nova palavra construída.

Aqui eu voltei no tempo. Com um pouquinho de cada fui revivendo um pretérito onde a preocupação era efêmera. No conviver de cada novo amigo novo, tudo se aquietava. Era o gel da Thyara que fazia seu mau humor virar uma dádiva, as dúvidas eloqüentes do Giarlã que traziam mais do que ele mesmo supunha, as desventuras românticas do Fabinho, o jeitinho de menina perdida da Jéssica pulando nos corredores do supermercado, os aromas da terra molhada que a Rita nos presenteava, a firmeza de propósito da Ana Paula, o ouvido sempre pronto da Aneli. E tinha Vanessa, Hana e Leandro. Dámaris, Mísia e mais Leandro! E tinha deitar na grama e tomar sorvete no pote. E conviver com vocês me fez ser alguém mais leve e melhor.

E teve quem veio de fora, de longe. E me ensinou tanto. Janine, inesquecível Janine, entre tanta coisa, me ensinou a vibrar com cada pequena conquista. Paul, possui uma grandeza que alimenta quem está ao seu redor. E uma sensibilidade em saber intervir no momento que mais precisamos.

E Matheus. Tem o Matheus. Que tanto nos orgulha. Que a todos conquistou com o paradoxo de seu jeito tímido, doce e seu humor sutil e ácido.

E na casa provisória, Pai José não era um nome de república, era algo para aglutinar. Lá, casa virou lar. Rafael, Luiz, Christian, Gustavo, Ítalo. Conrado e o pequeno grande ursão, Rayan. Foram bolos, pizzas... cafés intermináveis. E Rita Lee! Graças a vocês, a dor da distância de meu real lar se apaziguava.

Mas esta tese é para as mulheres. Por elas eu vim e por elas eu persisti. Sem elas eu não teria suportado.

– Papai, você já terminou a tese? (Giulia – 8 anos)

– Ainda não, pequena criança. Mas 2022 está perto. (Laís – 13 anos)

E foram os seis meses mais dolorosos, pois se perto de quem mais amo estava, perto não podia ficar.

E as mulheres que deixei ainda mais longe. Que sacrifiquei com tanta ausência. Minha mãezinha, tão forte, tão frágil, enfim agora posso ir te abraçar. Maninha, meu anjo da guarda, você sempre tão perto, mesmo tão longe. Vocês são a base que me mantêm.

E tem quem se torna irmã. E foi tão rápido, mesmo que com dias intermináveis.

Aninha, como eu faço agora sem você para discutir? “Viver é perder amigos”. Viver dói.

Minha querida orientadora, você não tem como saber o quanto que você me ensinou. E foi principalmente em pequenos atos e conversas passageiras que você fez toda a diferença. Mas foi quando eu mais precisei que encontrei não só a orientadora, mas a amiga que me deu a mão. Ainda temos muito a trilhar, e eu continuarei a aprender com você.

Mas se tantos me ajudaram e fizeram mais fácil cada dia meu, teve quem se doou completamente para que eu pudesse conseguir. Que abdicou de noites, que não teve descanso, que deixou de viver para si. Que velou sozinha o sono de quem amamos, que correu ao médico. E correu de novo. E que esteve sozinha para que eu pudesse me dedicar. Que ficava quietinha, angustiada em silêncio, querendo saber se agora ia, se eu conseguiria ou não. Sempre lá. Sempre me apoiando, sempre me esperando.

Te amo, Andréia.

A tempo: Obrigado, Alexandra Elbakyan.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	3
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	3
Pequenos RNAs regulatórios (sRNAs)	6
Interação sRNA com proteínas.....	7
Pareamento entre sRNA e mRNAs alvos.....	8
Mecanismos de ação dos sRNA <i>trans</i>	9
sRNAs e virulência	11
Histórico da elaboração de vacinas contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	13
Abordagem <i>in silico</i> dos alvos e função biológica de sRNAs	16
HIPÓTESE	20
OBJETIVOS	20
Geral.....	20
Específicos	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
Obtenção das linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> Δ sRNAs.....	22
Linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> utilizadas.....	22
Sequências de sRNAs utilizadas para a construção dos cassetes de DNA de inativação	23
Obtenção dos cassetes de DNA utilizados para interromper os genes sRNAs	24
Obtenção e confirmação das linhagens App Δ sRNAs	26
Investigação da natureza não polar dos transformantes.....	27
Caracterização fenotípica das linhagens de App Δ sRNA	28
Determinação e análise das curvas de crescimento.....	28
Adesão em superfície abiótica	29
Adesão em superfície biótica	30
Sensibilidade a agentes estressores e a antibióticos.....	32

Análise da capacidade hemolítica	35
Análise da virulência no modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i>	35
Análise da colonização da linhagem Δ rna01 em <i>Galleria mellonella</i>	36
Análises <i>in silico</i>	37
Pesquisa de sRNAs homólogos.....	39
Análise da conservação dos sRNAs.....	39
Análise filogenética dos sRNAs.....	40
Predição dos mRNAs alvos.....	40
Anotação funcional dos mRNAs alvos preditos	41
Enriquecimento funcional	42
RESULTADOS	45
Obtenção das linhagens de App Δ sRNAs	45
Análises fenotípicas das linhagens de App Δ sRNAs	50
Análise do crescimento	50
Ensaio de adesão em superfície abiótica e biótica.....	52
Sensibilidade a agentes estressores e antibióticos.....	55
Atividade hemolítica	57
Ensaio de virulência no modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i>	58
Colonização da linhagem WT_ Δ rna01 em <i>Galleria mellonella</i>	61
Análises <i>in silico</i>	63
Os sRNAs estão presentes na família Pasteurellaceae	63
Os sRNAs homólogos possuem regiões altamente conservadas.	65
Os sRNAs interagem com mRNAs.....	77
Os sRNAs interagem com regiões específicas dos mRNAs	96
Arrc14 interage com o metabolismo de amino e nucleotídeos açúcares	104
DISCUSSÃO	108
Características fenotípicas de App Δ sRNAs.....	108
GcvB: um sRNA regulador do metabolismo de aminoácidos	119
Distribuição filogenética dos sRNAs.....	122
A interação sRNA-mRNA ocorre em regiões altamente conservadas do sRNA.....	124
Os alvos preditos para os sRNAs possuem uma miríade de funções biológicas.....	125
Arrc14 regula o metabolismo de amino açúcares e nucleotídeos açúcares	128
CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS	131
MATERIAL SUPLEMENTAR	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de força atômica de células de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 8 coletadas no meio da fase exponencial de crescimento...	4
Figura 2. Mecanismos de ação dos sRNAs <i>trans</i>	10
Figura 3. Estratégia de obtenção de <i>A. pleuropneumoniae</i> MIDG2331 Δ <i>gcvB</i>	25
Figura 4. Organização da microplaca para análise da sensibilidade a antibióticos por linhagens de App parentais e Δ sRNAs.....	34
Figura 5. Pipeline utilizada para análise <i>in silico</i> dos sRNAs.....	37
Figura 6. Verificação das linhagens de App Δ sRNAs.....	48
Figura 7. Confirmação da natureza não polar das mutações introduzidas nas linhagens de App Δ sRNA investigadas.....	49
Figura 8. Crescimento das linhagens de App parentais e Δ sRNAs.....	51
Figura 9. Aderência de linhagens de App Δ sRNA.....	52
Figura 10. Ensaio de aderência das linhagens de App parentais e Δ sRNA em monocamadas de células PK15.....	54
Figura 11. Perfil de sensibilidade das linhagens de App parentais e Δ sRNAs a estresses osmótico e oxidativo.....	56
Figura 12. Atividade hemolítica das linhagens App Δ sRNAs.....	58
Figura 13. Ensaio de virulência das linhagens de App parentais e Δ sRNAs em <i>Galleria mellonella</i>	60
Figura 14. Colonização da linhagem WT_ Δ <i>rna01</i> em <i>Galleria mellonella</i>	62
Figura 15. Os homólogos para sRNAs foram identificados em 14 espécies de bactérias da família Pasteurellaceae e em uma espécie de fago da família Siphoviridae.....	65
Figura 16. Predição de homólogos para GcvG obtida por GLASSgo.....	68
Figura 17. Predição de homólogos para RNA01 obtida por GLASSgo.....	70
Figura 18. Predição de homólogos para RNA02 obtida por GLASSgo.....	72
Figura 19. Predição de homólogos para Arrc14 obtida por GLASSgo.....	74
Figura 20. Predição de homólogos para Arrc16 obtida por GLASSgo.....	76
Figura 21. Estrutura secundária do sRNA RNA04 predita por RNAfold.....	77
Figura 22. Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para GcvB.....	80

Figura 23. Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para RNA01.....	83
Figura 24. Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para RNA02.....	86
Figura 25. Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para Arrc14.....	89
Figura 26. Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para Arrc16.....	92
Figura 27. Rota metabólica do nitrogênio obtida para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	93
Figura 28. Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para RNA04.....	95
Figura 29. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para GcvB e seus mRNAs alvos.....	97
Figura 30. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para RNA01 e seus mRNAs alvos.....	98
Figura 31. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para RNA02 e seus mRNAs alvos.....	99
Figura 32. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para Arrc14 e seus mRNAs alvos.....	101
Figura 33. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para Arrc16 e seus mRNAs alvos.....	102
Figura 34. Visualização dos domínios de interação preditos por IntaRNA para RNA04 e seus mRNAs alvos.....	103
Figura 35. BLASTp de MIDG2331_RS01730 contra APL_0334 de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20 e RapZ de <i>Escherichia coli</i> K12.....	104
Figura 36. Rede de interação obtida para a proteína RapZ, utilizando dados descritos para <i>Escherichia coli</i> K12.....	105
Figura 37. Rota metabólica do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20.....	106
Figura 38. Interação entre Arrc14 e MIDG2331_RS01730.....	107
Figura 39. Proposta de mecanismo de ação para Arrc14.....	129
Figura S1. Determinação da CIM para linhagens parentais e Δ sRNA de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> MIDG2331.....	141
Figura S2. Distribuição do sRNA GcvB.....	143
Figura S3. BLASTn da sequência de GcvB de <i>Escherichia coli</i> K12 (Query) contra GcvB de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> MIDG2331 (sbjct).....	144
Figura S4. Sequência de GcvB de App MIDG2331.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> utilizadas neste trabalho.....	22
Tabela 2. sRNAs utilizados neste trabalho para a obtenção dos cassetes de DNA de inativação.....	24
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para a confirmação das linhagens Δ sRNAs.....	26
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados na análise da natureza não polar das linhagens Δ sRNAs obtidas.....	28
Tabela 5. Sequência dos sRNA e <i>locus</i> gênico no genoma de App MIDG2331.....	38
Tabela 6. Ferramentas e recursos computacionais utilizados nas análises <i>in silico</i>	38
Tabela 7. sRNAs homólogos utilizados na predição de alvos para cada sRNAs.....	41
Tabela 8. Distribuição dos homólogos detectados para os sRNAs no domínio Bacteria.....	64
Tabela 9. Características dos homólogos identificados para sRNAs.....	66
Tabela 10. Alvos preditos para GcvB no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.....	78
Tabela 11. Alvos preditos para RNA01 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.....	82
Tabela 12. Alvos preditos para RNA02 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.....	85
Tabela 13. Alvos preditos para Arrc14 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.....	88
Tabela 14. Alvos preditos para Arrc16 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.....	91
Tabela 15. Alvos preditos para RNA04 no genoma de MIDG2331 por IntaRNA...	94
Tabela S1. Concentração inibitória mínima das linhagens de App parentais e Δ sRNAs.....	142

RESUMO

SANCHES, Newton Moreno, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2018. **Análise *in silico* e caracterização funcional de RNAs pequenos reguladores: alvos e fenótipos envolvidos em *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzoli. Coorientadores: Eduardo de Almeida Marques e Marisa Vieira de Queiroz.

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) é o agente causal da pleuropneumonia suína, doença que causa uma pleuropneumonia fibrinosa, exsudativa, hemorrágica, necrosante, que afeta porcos de todas as idades, levando à morte súbita e grandes perdas econômicas em todo o mundo. Existem dois métodos básicos para limitar a infecção endêmica de App: antibióticos e vacinas, mas a segunda opção não é eficiente para controlar a pleuropneumonia porcina. A virulência de App é complexa e envolve diferentes fatores bacterianos que incluem exotoxinas, polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos. Além disso, existem fatores adicionais de virulência que são *up*- ou *down*-regulados durante a infecção e pequenos RNAs reguladores (sRNAs) podem regulá-los. Recentemente, nosso grupo identificou 23 sRNAs em App, cuja transcrição foi validada por RNA-Seq. Neste trabalho selecionamos seis genes sRNA e produzimos mutantes de deleção a partir dos parentais selvagem (WT_ΔsRNA) e de seu mutante isogênico para a chaperona de sRNAs, Hfq (Δhfq_ΔsRNA). Além disso, propomos uma análise robusta *in silico* da estrutura, conservação e interação dos RNAs de App com seus alvos. Os fenótipos desses mutantes foram comparados aos da linhagem parental sob diferentes condições, como: curva de crescimento, crescimento sob diferentes condições de estresse, determinação da concentração inibitória mínima contra antibióticos, adesão em superfícies bióticas e abióticas, atividade hemolítica e virulência no modelo alternativo de infecção, *Galleria mellonella*. As linhagens ΔsRNA exibiram uma diferença fenotípica em relação às linhagens parentais sob pelo menos uma condição, revelando que os sRNAs de App estão envolvidos na regulação da virulência. Notavelmente, alguns mutantes de deleção simples mostraram um fenótipo de ganho de função, que ainda não foi descrito para nenhum outro mutante de deleção de gene de sRNA na família Pasteurellaceae. Além disso, um mutante mostrou uma forte atenuação de virulência, sendo um candidato para elaboração de uma vacina viva atenuada contra *A. pleuropneumoniae*. As análises *in silico* revelaram a presença de sRNAs de App em seis gêneros da família Pasteurellaceae. Vários alvos foram encontrados e categorizados em diferentes funções, evidenciando uma complexa rede de regulação gênica para esses

RNAs. A partir desses resultados, propomos um modelo de ação via Arrc14 em que ele atua como regulador negativo no metabolismo de amino e nucleotídeo açúcares. Nossos resultados permitem concluir que os sRNAs aqui estudados interferem de forma distinta na regulação da virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8. Concluimos ainda que, com base nos dados obtidos para RNA01, a linhagem WT_Δ*rna01* possui potencial para ser utilizada no desenvolvimento de uma vacina atenuada viva para prevenir e controlar infecções por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

ABSTRACT

SANCHES, Newton Moreno, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2018. ***In silico* analysis and functional characterization of small regulatory RNAs: targets and phenotypes involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae*** Adviser: Denise Mara Soares Bazzoli. Co-advisers: Eduardo de Almeida Marques and Marisa Vieira de Queiroz.

Actinobacillus pleuropneumoniae (App), the porcine pleuropneumonia's causative agent, a fibrinous, exudative, hemorrhagic, necrotizing pleuropneumonia affecting pigs of all ages, leading to sudden death and great economic loss worldwide. There are two basic methods used to limit endemic infection of App: antibiotics and vaccines, but the second option is not efficient to control porcine pleuropneumonia. The App virulence is complex and involves different bacterial factors including exotoxins, capsular polysaccharides, and lipopolysaccharides. Beyond these, there are additional APP virulence factors that are down- or up-regulated during infection and regulatory small RNAs (sRNAs) can regulate them. Recently, our group identified 23 sRNAs in App, whose transcription was validated by RNA-Seq. In this work we selected six sRNA genes and produced deletion mutants from wild-type parental (WT_ΔsRNA) and its isogenic mutant for the sRNA chaperone, Hfq (Δhfq_ΔsRNA). In addition, we propose a robust *in silico* analysis of the structure, conservation and interaction of APP sRNAs with their targets. The phenotypes of these mutants were compared to that of the parental strain under different conditions, i.e. growth curve, growth under different stress conditions, determination of minimum inhibitory concentration against antibiotics, adhesion on biotic and abiotic surfaces, hemolytic activity and virulence in the alternative infection model *Galleria mellonella*. The ΔsRNA strains exhibited a phenotype difference from the parental strains under at least one condition, revealing that App sRNAs are involved in virulence regulation. Notably, simple deletion mutants showed a gain of function phenotype, which has not yet been described for any other sRNA gene deletion mutant in the Pasteurellaceae family. In addition, a mutant showed a strong attenuation of virulence, being a promising live-attenuated vaccine candidate against App. *In silico* analysis revealed the presence of App sRNAs in six genera of the Pasteurellaceae family. Several putative targets were found and categorized in different functions, evidencing a complex gene regulation network by these sRNAs. From these results, we propose a model of action via Arrc14 in which it acts as a negative regulator in amino and nucleotide sugars metabolism. Our results allow us to conclude that the sRNAs studied here interfere differently in virulence regulation of *Actinobacillus*

pleuropneumoniae serotype 8. We also conclude, based on the data obtained for RNA01, that the WT_Δrna01 line has potential to be used in the development of a live attenuated vaccine to prevent and control *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas entéricas e respiratórias são a maior causa de morbidade e mortalidade em mamíferos criados em sistemas pecuários de produção intensiva. Diferentes medidas de controle são usualmente empregadas para minimizar a dispersão de agentes infecciosos nestes ambientes, como a quimioterapia por restrição por antibióticos e a vacinação. Apesar de diversos avanços nestas linhas, estas doenças permanecem como sendo o maior obstáculo ao aumento da produtividade e a vacinação tem sido a melhor intervenção para reduzir a morbidade e mortalidade causada pelas doenças infecciosas.

Por mais de um século as vacinas foram desenvolvidas de acordo com o paradigma básico de Pasteur que estabeleceu uma estratégia que inclui o isolamento, inativação e inoculação do agente causal da doença infecciosa. Esta abordagem tradicional tem sido gradualmente substituída em função de dois grandes avanços: i) a melhor compreensão dos processos de patogenia, infecções microbianas e identificação dos fatores de virulência e ii) a melhor caracterização da resposta imune ao agente infeccioso. A compreensão destes fatores levou ao desenvolvimento de vacinas de segunda geração, como as vacinas racionalmente atenuadas, ao uso de componentes antigênicos e às vacinas de subunidades produzidas com ou sem o auxílio da tecnologia de DNA recombinante. Apesar do relativo sucesso obtido no desenvolvimento destas vacinas, muitas espécies com múltiplos fatores de virulência ainda são desafios constantes para a elaboração de vacinas que induzam uma resposta protetora efetiva.

Neste contexto, a bactéria Gram negativa *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), agente causal da pleuropneumonia suína, doença que acomete suínos de todas as idades e possui um forte impacto no bem-estar dos animais e na economia das indústrias de criação de suínos, ainda é um desafio no que diz respeito a um controle efetivo da doença. A infecção por *A. pleuropneumoniae* é um processo multifatorial no qual muitos fatores de

virulência agem de forma conjunta e complexa no estabelecimento da doença. Atualmente, são reconhecidos 18 sorotipos diferentes, baseando-se em características de sorotipagem e antígenos capsulares e estes apresentam padrões diferenciados de virulência. A variação da virulência entre os sorotipos pode ser atribuída tanto à ausência de genes envolvidos na virulência quanto à expressão diferenciada de exotoxinas secretadas pela bactéria, capacidade de formar biofilmes, otimizada interação patógeno – hospedeiro, componentes na superfície de App como adesinas, fimbrias e aos diferentes componentes do sistema de transporte de ferro, entre outros. A regulação destes fatores pode ser compreendida a partir do ponto de vista transcricional e a ação conjunta desses fatores reguladores contribui para a plasticidade fenotípica de App e assim se relacionam com o sucesso do desenvolvimento da pleuropneumonia suína.

Nos últimos anos é evidente o envolvimento de pequenos RNAs não codificantes (sRNAs) em processos que envolvam a regulação da expressão gênica global, como resposta a diferentes condições ambientais e à virulência, o que influencia no processo de patogênese. Este panorama é comprovado em diferentes patógenos bacterianos, mas nunca explorado em App. Sendo assim, neste trabalho foi investigado o papel de diferentes sRNAs, previamente identificados e validados por nosso grupo, no fenótipo selvagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 e assim gerar informações que possam subsidiar no futuro a elaboração de uma vacina atenuada baseada em mutantes de sRNA.

REFERENCIAL TEÓRICO

Actinobacillus pleuropneumoniae

Actinobacillus pleuropneumoniae (App), agente causal da pleuropneumonia suína, é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia facultativa da família Pasteurellaceae, que apresenta dois biótipos: biovar 1 (β -NAD-dependente) e biovar 2 (β -NAD-independente) (NIVEN; LEVESQUE, 1988). App apresenta formato de cocobacilo com tamanho aproximado de 0,4 x 1,0 μ M (DONACHIE; LAINSON; HODGSON, 1995) (Figura 1). Sua ultraestrutura mostra a presença de cápsula e de fimbrias do tipo IV e a tipagem molecular e sorológica de polissacarídeos capsulares revela 18 diferentes sorotipos de App (BOSSÉ et al., 2017; SÁRKÖZI; MAKRAI FODOR, 2015). Na maioria dos rebanhos, pode haver a predominância de um sorotipo, embora diferentes sorotipos possam ser encontrados na mesma fazenda (BOSSÉ et al., 2017; CHIERS et al., 2010). A distribuição dos sorotipos varia de acordo com as regiões do mundo: vários sorotipos são relatados na América do Norte, incluindo os sorotipos 1, 3, 5 - 8, 12 e 15; o sorotipo 2 predomina em muitos países europeus (JACQUES

, 2004) e o sorotipo 8 é predominante no Reino Unido (DUBREUIL et al., 2000; O'NEILL et al., 2010) e sudeste do Brasil (ROSSI et al., 2013), além de ter sido recentemente isolado nos Estados Unidos e Canadá (GOTTSCHALK; LACOUTURE, 2014). Este sorotipo é pouco explorado e muitas vezes negligenciado nos estudos epidemiológicos disponíveis, sendo, portanto, o alvo deste estudo.

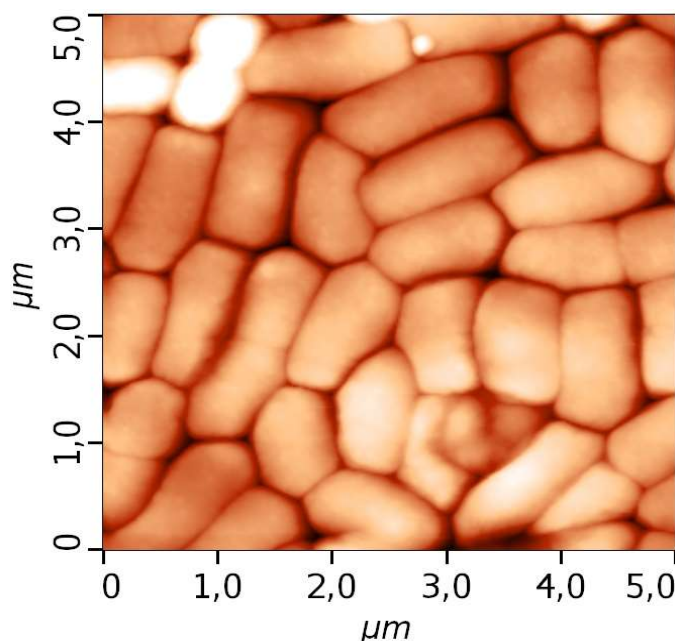


Figura 1. Microscopia de força atômica de células de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8 coletadas no meio da fase exponencial de crescimento (arquivo pessoal e colaboração do prof. Sukarno Olavo Pereira, DPF, UFV).

O genoma de App é composto por um único cromossomo circular com tamanho médio de 2,37 Mb, 40 - 42,0% de conteúdo GC e em média 2.247 genes (BOSSÉ et al., 2016). Segundo XU et al. (2010), o pangenoma de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, analisado a partir de 12 sorotipos (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5b, 6, 7, 9, 10, 11, 12 e 13) consiste de 3.303 *clusters* de genes, dos quais 1709 compõe o genoma *core*, sendo 822 genes compartilhados por ao menos duas espécies e 772 linhagem-específica. A diversidade genética encontrada pelos autores entre os genomas investigados relaciona-se em especial à biogênese da cápsula e ao antígeno O da camada de lipopolissacarídeos. Apesar de todos os sorotipos serem patogênicos, há uma diferença significativa no perfil de virulência entre eles (HAESEBROUCK, 2004).

A virulência de App é multifatorial (SASSU et al., 2017), sendo a secreção de exotoxinas um dos principais fatores (FREY, 1995). As exotoxinas de App pertencem ao grupo de proteínas RTX (*repeats in the structural toxin*), que são proteínas produtoras de poros produzidas por uma grande variedade de bactérias Gram negativas patogênicas (FREY; KUHNERT, 2002). As proteínas RTX de App são designadas de Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae toxins*) e possuem distribuição distinta entre os

diversos sorotipos. Atualmente, são conhecidas quatro exotoxinas, designadas de ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV que possuem diferentes padrões de atividade hemolítica e/ou citolítica nas células do hospedeiro (FREY, 2011; LINHARTOVÁ et al., 2010). App sorotipo 8 secreta as exotoxinas ApxII, ApxIII e ApxIV, sendo considerado um sorotipo de virulência moderada (KLITGAARD et al., 2012).

A pleuropneumonia suína é uma pleuropneumonia fibrinosa, exsudativa, hemorrágica e necrosante que afeta todas as idades de porcos, levando à morte súbita e portanto, responsável por significativas perdas em todos os países produtores de carne suína (CHIEN et al., 2009). O mecanismo de injúria na pleuropneumonia suína é causado pela lesão e morte das células do sistema respiratório, em especial as do sistema vascular, derivado dos efeitos das toxinas bacterianas e da inflamação aguda e seus mediadores e enzimas degradativas (SASSU et al., 2017). Lesões macroscópicas, atribuídas à lesão vascular afetam o pulmão e o tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) e incluem edema e alterações na permeabilidade vascular; pneumonia fibrinosa e hemorrágica; efusão pericardial e pleural e inflamação necrotizante aguda (CHASE; LUNNEY, 2012).

Os suínos entram em contato com a bactéria App por meio da inalação da mesma, presente em fômites ou gotículas de secreções (BALTES; HENNIG-PAUKA; GERLACH, 2002). No sistema respiratório a bactéria coloniza as mucosas aderindo à membrana das células epiteliais por meio de suas fimbrias, além de se ligar fortemente aos cílios e membranas de bronquíolos terminais e fracamente aos cílios e ao epitélio da traqueia e brônquios (FREY, 1995; TREMBLAY et al., 2013; ZHOU et al., 2013). App requer ferro para seu metabolismo e utiliza a transferrina porcina para a sua aquisição (JACQUES, 2004; TREMBLAY; DESLANDES; JACQUES, 2013). Uma vez que a colonização é estabelecida, a bactéria é fagocitada por macrófagos alveolares intersticiais e intravasculares, liberando citocinas que recrutam neutrófilos para o foco de infecção (KLITGAARD et al., 2012), os quais são capazes de eliminar as bactérias, ao contrário dos macrófagos inflamatórios, que

não são capazes de matar App (BOSSÉ et al., 2002; SASSU et al., 2017). App pode sobreviver durante mais de 90 minutos num fagossoma de um macrófago, durante o qual ela cresce, replica e secreta as toxinas Apx, levando à piroptose e consequente liberação da bactéria. A permanência da bactéria no interior dos macrófagos auxilia na dispersão das bactérias no tecido pulmonar (CHASE; LUNNEY, 2012; SASSU et al., 2017).

Pequenos RNAs regulatórios (sRNAs)

Nos últimos 15 anos, a descoberta de uma nova classe de biomoléculas reguladoras, denominados de pequenos RNAs não-codificantes (ncRNAs) ou pequenos RNAs regulatórios (sRNAs), desafiou a percepção de longa data que as proteínas são os reguladores predominantes da expressão gênica (BARTEL, 2004; STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011). Os sRNAs estão presentes em todos os domínios da vida e tornam-se cada vez mais reconhecidos como uma nova e importante classe de reguladores da expressão gênica (AZAM; VANDERPOOL, 2017). Em bactérias, um número expressivo destes reguladores são transcritos como RNAs relativamente curtos que variam entre 50 e 300 nucleotídeos (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011), mas podem chegar a até 500 nucleotídeos (KWENDA et al., 2016) os quais atuam nos alvos de forma independente (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011) ou auxiliados por uma proteína chaperona de RNA (VOGEL; LUISI, 2011). Atualmente, os sRNAs estão relacionados a vários sistemas que contribuem para modular a virulência e vários processos fisiológicos nas bactérias, tais como a homeostase da membrana externa (FRÖHLICH et al., 2012), o *quorum sensing* (SHAO et al., 2013), homeostase do ferro (PORCHERON; DOZOIS, 2015), formação de biofilme (MONTEIRO et al., 2012; XIE et al., 2016), reconhecimento da célula hospedeira (STERZENBACH et al., 2013), metabolismo de aminoácidos (VANDERPOOL; BOBROVSKYY; RICHARDS, 2015), motilidade (FUENTES et al., 2015), patogenia (BHADURI; WESLEY, 2012), resposta

ao estresse (KLEIN; RAINA, 2017) e a adaptação às diferentes condições de crescimento (MICHAUX et al., 2014a). Os sRNAs representam uma ferramenta útil na regulação da expressão genética devido ao seu baixo custo energético e síntese rápida, particularmente quando são necessárias respostas rápidas (FUENTES et al., 2015). No que se refere à classificação dos sRNAs em bactérias, eles podem ser divididos em RNAs que modulam a atividade protéica, RNAs *cis*-codificados, RNAs *trans*-codificados e CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011). Essas classes regulam os alvos por dois mecanismos gerais de ação (GOTTESMAN, 2004): i) a interação sRNAs com proteínas; e ii) pareamento entre o sRNA e o mRNA cognato (completo ou parcial), o qual é o mecanismo mais comum (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011).

Interação sRNA com proteínas

Os sRNAs podem afetar diretamente a ação de proteínas associando-se a elas e modificando sua atividade (REPOILA; DARFEUILLE, 2009). Um exemplo é o sRNA SsrS, também chamado de 6S, que é um regulador global do processo de transcrição envolvido na modulação ao estresse e durante a limitação de nutrientes, sendo seu mecanismo de ação bem conhecido em *Escherichia coli* (CAVANAGH; WASSARMAN, 2014) e já identificado em *App* (ROSSI et al., 2016). SsrS interage com o fator sigma 70 (σ^{70}) da RNA polimerase holoenzima bloqueando seletivamente o acesso da holoenzima ao promotor da maior parte dos genes expressos em condições normais da célula, o que permite a interação com outro fator sigma e a expressão de genes relacionados a condições de estresse e fase estacionária (WASSARMAN, 2007). Um outro ncRNA que altera a atividade proteica por interação direta é o CsrB, o qual interage, entre outros mecanismos, com o regulador traducional CsrA bloqueando o seu acesso à região 5' UTR de mRNAs alvos (GOTTESMAN, 2004). CsrB é

amplamente distribuído entre bactérias Gram negativas (REPOILA; DARFEUILLE, 2009), incluindo App (ROSSI et al. 2016), e pode regular uma gama de fenótipos, como o controle do fluxo de carbono, biofilme, motilidade, formação de cápsula e virulência (KLEIN; RAINA, 2017).

Pareamento entre sRNA e mRNAs alvos

A maioria dos sRNAs estudados realizam o controle da expressão gênica pelo pareamento com seus alvos cognatos, os mRNAs. O pareamento pode ocorrer por sRNAs codificados na fita oposta codificadora do mRNA alvo (sRNAs *cis*-codificados ou *cis*-antisense) e, portanto, apresentam uma complementariedade alta com os alvos (MICHAUX et al., 2014b), ou podem ser codificados em um *locus* distante do seu alvo cognato (sRNAs *trans*-codificados). Um exemplo de regulação por sRNA *cis*-codificado é encontrado em *Salmonella*. O operon *mgtMPCBR* medeia a sobrevivência e virulência de *Salmonella* no interior de macrófagos em camundongos. Um sRNA *cis*-codificado de 1.2 kb, denominado de *AmgR*, é transcrito a partir da região intergênica *mgtC*-*mgtB* e é complementar a toda sequência *mgtMPC* no terminal 5' do mRNA *mgtMPCBR*. Assim, *AmgR* controla negativamente os níveis de *MgtC* e *MgtB* e a virulência de *Salmonella* (HAN et al., 2013).

Os sRNAs *trans* podem atuar sobre diferentes mRNAs alvos e envolvem pequenas sequências de reconhecimento, denominadas de sequências *seed* (RYAN; MUKHERJEE; SUAR, 2017). As interações sRNA *trans* – mRNA dependem na maior parte das vezes de uma chaperona de RNA para estabilizar a interação, como a proteína Hfq e a ProQ (SAUER, 2013; SMIRNOV et al., 2016). Em App alguns sRNAs *trans* já foram identificados, como o 6S e *GcvB* (ROSSI et al., 2016). *GcvB* é um regulador global que atua principalmente no transporte e metabolismo de aminoácidos, reprimindo o transporte de dipeptídeos e aumentando a sobrevivência da bactéria em pH ácido

(MICHAUX et al., 2014b). GcvB é dependente da chaperona Hfq e possui diferentes mRNAs alvos que podem ser reprimidos ou ativados pelo sRNA (PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2009). Um outro sRNA com atuação *trans* é o GlmZ. Em Gamaproteobacterias, uma rota metabólica que é regulada por sRNAs *trans* é a da biogênese de glucosamina, um precursor inicial essencial para a síntese de peptideoglicanos e lipopolissacarídeos. Na regulação desta rota, o sRNA GlmZ estimula a tradução da enzima glucosamina-6-fosfato sintase (GlmS), que atua como primeiro passo nesta rota. Auxiliado pela chaperona Hfq, GlmZ se pareia com uma sequência anti-Shine-Dalgarno do mRNA codificador (glmS), promovendo tanto a tradução quanto a estabilidade do transcrito (GONZALEZ et al., 2017).

Mecanismos de ação dos sRNA *trans*

Os sRNA *trans* atuam sobre os mRNAs alvo por pareamento imperfeito de bases, não contínuo, e controlam a tradução e regulam a estabilidade do mRNA (PAPENFORT; VANDERPOOL, 2015). Alguns sRNAs regulam seu alvo positivamente, por exemplo, através do pareamento na região 5'-UTR do mRNA, impedindo a formação de uma estrutura secundária capaz de inibir a tradução, ou pareando com sequências de reconhecimento de ribonuclease para estabilizar um mRNA alvo (LALAOUNA et al., 2013). Como regulação negativa, os sRNAs frequentemente, mas nem sempre, operam como repressor traducional por pareamento direto com uma sequência no sítio de ligação do ribossomo (RBS), impedindo a interação com o ribossomo (MICHAUX et al., 2014b). Independente do mecanismo de ação, os sRNA frequentemente dependem da proteína chaperone Hfq. Hfq é um fator chave na regulação mediada por sRNAs *trans* e no controle da estabilidade de mRNAs e sRNAs. A chaperona Hfq é uma proteína homohexamérica em forma de anel,

pertencente à grande família de proteínas Sm e Sm-like, presentes em todos os três domínios da vida e que se liga simultaneamente ao sRNA e ao mRNA (VINCENT et al., 2012), facilitando o pareamento entre eles. Outro papel importante de Hfq é a proteção dos sRNAs pela degradação mediada pela Rnase E (LALAOUNA et al., 2013). Os *trans*-sRNAs interagem com os seus alvos tanto na região 5'-UTR ou diretamente na janela de leitura (ORF) (FUENTES et al., 2015) enquanto que o terminal 3' dos sRNA, rico em uridina, é reconhecido especificamente pela Hfq (SAUER; WEICHENRIEDER, 2011), facilitando o pareamento do sRNA com o mRNA alvo (PAPENFORT; VANDERPOOL, 2015). Muitas vezes, os sRNAs podem atuar nos mRNAs alvos como um fator de transcrição provocando uma resposta global (VINCENT et al., 2012).

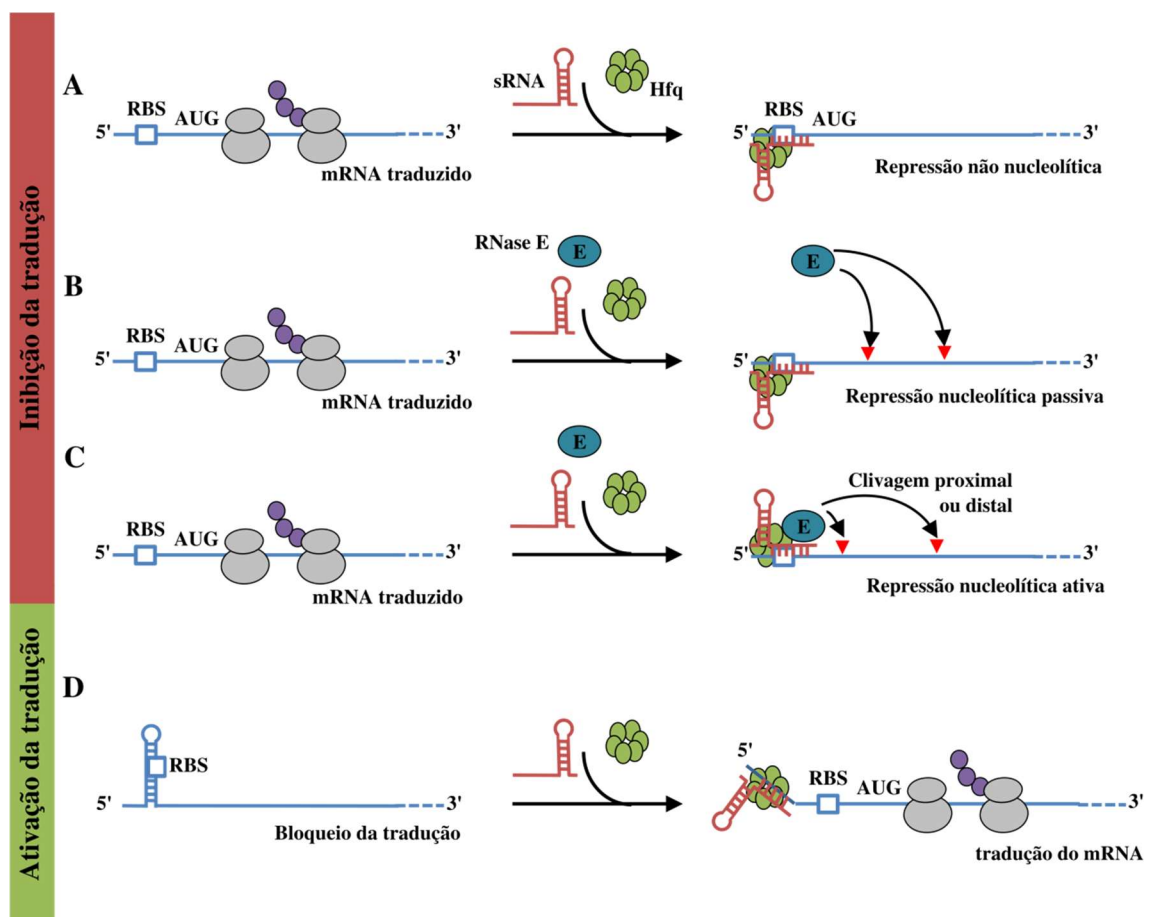


Figura 2. Mecanismos de ação dos sRNAs *trans*. O pareamento dos *trans*-sRNAs com o mRNA alvo pode reprimir a tradução (A) através do bloqueio do sítio de ligação do ribossomo (RBS) ou por facilitar a ação de endonucleases (B e C) que degradam o mRNA. O aumento da tradução pode ocorrer pela inibição de estruturas secundárias (D) que impedem o acesso do ribossomo. Fonte: Lalaouna, 2013.

sRNAs e virulência

Durante o processo infeccioso, as bactérias patogênicas se adaptam ao ambiente encontrado no hospedeiro por meio da expressão temporal de seus genes de virulência e de plasticidade ao estresse. Assim, deve haver uma resposta coordenada que envolva a expressão destes genes. Para que esta resposta seja rápida, a regulação por sRNAs é um mecanismo mais eficiente do que o envolvimento de regulação por proteínas (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011). Os mecanismos moleculares de controle da expressão de genes de virulência baseados em sRNA são muito versáteis, mas podem compartilhar semelhanças notáveis entre espécies relacionadas. Os mecanismos podem variar da regulação da transcrição e tradução ao controle da conformação do RNA e estabilidade do RNA (WATERS; STORZ, 2009). A grande maioria dos sRNAs possui múltiplos mRNAs alvo e influencia processos numerosos e distintos, envolvidos com funções *housekeeping*, regulação de virulência e resposta a mudanças ambientais (HEROVEN; NUSS; DERSCH, 2017).

Encontrar a função biológica de um sRNA é um trabalho árduo, dado a miríade de alvos que os sRNAs *trans* podem interagir e regular (WRIGHT et al., 2013). Uma abordagem para compreender a função biológica dos sRNAs é descobrir fenótipos associados a deleções de seus genes codificadores. A existência de um fenótipo de deleção indica que um sRNA desempenha uma função biologicamente relevante que é passível de estudo em laboratório. Além de demonstrar a relevância fisiológica do gene, a descoberta de um fenótipo de deleção facilita enormemente o estudo do sRNA correspondente por análises genéticas adicionais (HOBBS; ASTARITA; STORZ, 2010).

Atualmente, diversos sRNAs têm sido relacionados com a virulência bacteriana por meio da abordagem de deleção do gene codificador para o sRNA. Alguns exemplos são o sRNA SgrS de *Escherichia coli* que atua no controle do estresse nutricional (MAKI et al.,

2010) e RybB, que atua na formação da membrana externa da bactéria regulando negativamente a expressão dos mRNAs *ompW* e *ompC* pelo bloqueio da região RBS (PAPENFORT et al., 2010). Em Pasteurellaceae, o conhecimento sobre sRNAs e sua associação com a virulência e resistência ao estresse ainda é bastante limitado. A seguir são apresentados dois exemplos já conhecidos para este mecanismo de controle em Pasteurellaceae.

Um importante fator de virulência para bactérias é a capacidade de sobreviver e crescer em um ambiente com limitação de ferro (BOSSÉ et al., 2002; SASSU et al., 2017). O ferro está envolvido em vias metabólicas, respiração, transporte de oxigênio, síntese de DNA e síntese de metabólitos (CHAREYRE; MANDIN, 2018) e é fundamental para as bactérias no estabelecimento da infecção. Em muitas bactérias, incluindo *App*, o nível e a utilização do ferro intracelular são controlados pela proteína reguladora Fur (SANTANA et al., 2014), a qual reprime a expressão de genes codificadores para sideróforos (HO; ELLERMEIER, 2015). Fur também pode atuar como ativador da expressão gênica por três mecanismos distintos: i) indiretamente via sRNAs, ii) ligação a elementos reguladores *cis* que aumentam o recrutamento da holoenzima RNA polimerase e iii) atuando como um anti-repressor pela remoção ou bloqueio da ligação do DNA de um repressor de transcrição (Troxell; HASSAN, 2013). Assim, Fur atua como regulador genético global em numerosas funções da célula como a respiração, glicólise, metabolismo das purinas e a resistência ao estresse redox (CHAREYRE; MANDIN, 2018). Através da construção de uma série de mutantes com deleção de genes, SANTANA et al. (2014) identificou um sRNA *trans*, nomeado de HrrF, em *Haemophilus influenzae*. Posteriormente, homólogos de HrrF foram encontrados em outros gêneros de Pasteurellaceae, incluindo em *Actinobacillus* (SANTANA et al., 2014). HrrF possui expressão máxima quando os níveis de ferro estão baixos. O regulador Fur controla a expressão de HrrF ligando-se *downstream* ao promotor *hrrF*. Os alvos de HrrF são mRNAs de genes cujos produtos estão envolvidos na absorção

de molibdato, síntese de desoxirribonucleotídeos e síntese de aminoácidos (SANTANA et al., 2014).

Um outro exemplo de sRNA envolvido na virulência e resistência a estresse é o GcvB, encontrado em bactérias das famílias Pasteurellaceae, Enterobacteriaceae e Vibrionaceae (KALVARI et al., 2018). O gene *gcvB* codifica para um sRNA envolvido na regulação de vários sistemas de transporte de aminoácidos, bem como genes biossintéticos de aminoácidos. A transcrição de GcvB é ativada pelo gene *gcvA* e reprimida pelo gene *gcvR* (JIN et al., 2009). A análise da deleção de GcvB em *Yersinia pestis* mostrou que ocorre alteração na morfologia da colônia, além de reduzir o crescimento (MCARTHUR; PULVERMACHER; STAUFFER, 2006). Em um outro trabalho, também por deleção gênica, foi demonstrado que o GcvB aumenta a capacidade de *E. coli* resistir em pH ácido por meio da regulação dos níveis do fator sigma alternativo RpoS (JIN et al., 2009). A interação de GcvB com sRNA SroC desencadeia a degradação de GcvB pela RNase E, aliviando a repressão dos mRNAs mediada por GcvB e de outros genes metabólicos e de transportes relacionados a aminoácidos (AZAM; VANDERPOOL, 2017; MIYAKOSHI; CHAO; VOGEL, 2015).

Histórico da elaboração de vacinas contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*

O desenvolvimento de uma vacina eficaz para App tem dispensado esforços desde 1994, quando Fenwick e colaboradores desenvolveram uma vacina a partir de extratos completos de células e obtiveram relativo sucesso na redução da mortalidade após desafio com sorotipo homólogo, mas insuficiente contra sorotipos heterólogos (DEL POZO SACRISTAN et al., 2014). Este problema de especificidade aos sorotipos foi contornado com a evolução das formulações a partir de bactérias inteiras para vacinas elaboradas a partir de subunidades de toxinas Apx e componentes bacterianos

identificados como candidatos vacinais em potencial (CHIERS et al., 2010).

Apesar da ampla proteção cruzada contra múltiplos sorotipos, as vacinas de subunidades baseadas em toxinas Apx não conferem proteção completa quando avaliadas em condições de campo (CHIERS et al., 1998; HABRUN et al., 2002; JIRAWATTANAPONG; L, 2007; SADILKOVA et al., 2012) e estudos epidemiológicos em países europeus que adotaram esquemas regulares de vacinação demonstraram que a pleuropneumonia é comumente encontrada em suínos abatidos (FABLET et al., 2012; FRAILE et al., 2010; Merialdi et al., 2012; MEYNS et al., 2011). Por outro lado, é amplamente conhecido que suínos que sobrevivem a uma infecção natural ou experimental com linhagens selvagens de App são parcialmente protegidos dos sintomas clínicos quando desafiados com um sorotipo heterólogo (MAAS et al., 2006) e completamente protegidos contra a reinfecção pelo mesmo sorotipo (RAMJEET et al., 2008).

Assim, em vista do insucesso das formulações vacinais anteriormente testadas, foi proposto o uso de linhagens selvagens que mantivessem a capacidade de colonizar o hospedeiro, porém sem causar doença clínica. TONPITAK *et al*, em 2002, propuseram o uso de uma linhagem do sorotipo 2 de App com deleção para os genes *apxIIA* e *ureC*. Este duplo mutante mostrou-se eficiente na proteção de suínos quando desafiados com linhagens homólogas. Entretanto, este protótipo vacinal causou doença clínica em uma pequena proporção de porcos testados. Outro grupo de pesquisa, liderado por MAAS *et al* (2006), utilizou o mesmo princípio proposto por TONPITAK e atenuou uma linhagem de App deletando genes envolvidos na virulência da bactéria. A bactéria mutante mostrou-se capaz de colonizar o tecido pulmonar, tonsilas e linfonodos dos suínos sem causar a doença clínica e se manteve por até seis semanas nos hospedeiros inoculados. Os suínos vacinados foram significativamente protegidos da doença clínica quando desafiados com um sorotipo heterólogo, suportando o conceito de que uma vacina atenuada de App fornece proteção cruzada. Apesar deste sucesso experimental, o

mutante produzido só induziu resposta imunológica após duas aplicações por via aérea e com altas doses de bactérias ($\sim 10^9$ UFC) e foi detectado predominantemente a resposta imune do tipo Th1 (MAAS et al., 2006).

O desenvolvimento de ferramentas genéticas de análises tem levado ao desenvolvimento de novas estratégias na busca de regiões imunogênicas da bactéria que estejam relacionadas com o processo de virulência e que possam ser utilizadas na elaboração de vacinas contra App (GOTTSCHALK; LACOUTURE, 2014). Esta abordagem, denominada de vacinologia reversa, baseia-se estritamente na informação genômica disponível, a fim de identificar *in silico* candidatos potencialmente vacinais (SERRUTO; RAPPUOLI, 2006). Uma das ferramentas derivadas da vacinologia reversa, denominada de Tecnologia de Expressão *in vivo* (IVET – *in vivo* Expression Technology) busca identificar fatores bacterianos que são preferencialmente expressos durante a infecção no hospedeiro, os quais são fatores potenciais para a virulência ou persistência da bactéria *in vivo* (ANGELICHIO; CAMILLI, 2002).

Em um dos primeiros trabalhos adotando esta tecnologia, FULLER et al. (2000) identificaram sequências com homologia para genes conhecidos a partir de uma biblioteca de 2400 clones contendo promotores induzidos durante infecção experimental de suínos. Esses genes foram denominados de genes *ivi* (*in vivo induced*) e mostraram estar envolvidos com o metabolismo e alguns com a virulência de App. Os autores construíram uma linhagem mutante auxotrófica que foi utilizada como uma potencial vacina atenuada. A vacina levou a uma redução na mortalidade quando os animais imunizados foram desafiados com sorotipos homólogos e/ou heterólogos. Entretanto, não ocorreu nenhuma redução significativa nos escores clínicos obtidos para as lesões pulmonares (RAMJEET et al., 2008).

Em outro estudo recente, ANTENUCCI et al. (2017) utilizou a vacinologia reversa para identificar imunógenos potenciais para todos os sorotipos de App. Após identificar as

proteínas VacJ e ApfA como bons candidatos, realizou um protocolo de imunização e desafios em suínos utilizando vesículas de membrana externa (OMVs) como adjuvante. Os resultados obtidos apresentaram um alto título de IgG contra as proteínas VacJ e ApfA, mas sem apresentar diminuição no escore das lesões nos animais imunizados, sendo obtido, inclusive, lesões mais acentuadas nos pulmões dos animais com maiores títulos de IgG.

Abordagem *in silico* dos alvos e função biológica de sRNAs

Nos últimos anos, tem-se expandido a compreensão de que os sRNAs desempenham um papel central nos mecanismos de regulação transcricional de bactérias (DUTCHER; RAGHAVAN, 2018). Os sRNAs são extremamente abundantes em vários genomas procarióticos (WRIGHT et al., 2014) e, com a identificação crescente de centenas de sRNAs em dezenas de espécies bacterianas (BHADURI; WESLEY, 2012), uma consequência natural tem sido buscar a compreensão da função destes recém sRNAs na regulação transcricional das bactérias. Apesar do conhecimento de que grande parte dos sRNAs identificados interagem com mRNAs, alterando sua estabilidade e/ou influenciando o processo de tradução de seu alvo (STORZ; VOGEL; WASSARMAN, 2011), a definição dos alvos para cada sRNA, assim como seu mecanismo de ação, permanecem desafiadores e as abordagens experimentais para compreensão de sua funcionalidade tendem a ser laboriosos, caros e em muitas situações não possuem modelos biológicos adequados. Além disso, a falta de direcionamento no estudo experimental dos alvos pode tornar a compreensão da função do sRNA inviável do ponto de vista temporal e econômico.

Para minimizar os esforços na busca da compreensão da funcionalidade dos sRNAs, o uso de ferramentas de bioinformática tem sido fundamental para direcionar os esforços da abordagem experimental. Assim, a modelagem *in silico* e a predição das

interações RNA-RNA são aspectos centrais para o estudo de novos sRNAs e, nas últimas décadas, várias abordagens para resolver este problema foram propostas (LAI; MEYER, 2016). Para permitir predições com alto índice de precisão, é necessário levar em conta a estabilidade (energia) de possíveis interações RNA-RNA e considerar a acessibilidade destas interações (UMU; GARDNER, 2017). Atualmente, as ferramentas CopraRNA, IntaRNA e TARGETRNA2 consideram estes fatores para realizarem a predição de mRNAs alvos (KERY et al., 2014; MANN; WRIGHT; BACKOFEN, 2017; WRIGHT et al., 2014). Entretanto, apesar da expectativa do uso de ferramentas de bioinformática na obtenção de mRNAs alvos e na geração de redes de interação, a predição *in silico* mostrou ser um desafio ainda maior em função da elevada heterogeneidade dos sRNAs em tamanho, estrutura e ao fato da complementaridade com o alvo ser imperfeita (VOGEL; WAGNER, 2007).

Assim, para uma caracterização funcional e evolutiva adequada dos sRNAs, se faz necessário a identificação de homólogos, o que é dificultado dada a natureza heterogênea, sequências relativamente curtas e poucas regiões conservadas (LOTT et al., 2018). A conservação da sequência de um sRNA, bem como sua distribuição filogenética, sinaliza que ele pode possuir função biológica, em especial quando existe grande distância evolutiva entre as espécies que apresentam os sRNAs homólogos (WRIGHT; GEORG, 2018). Além disso, a presença de homólogos habilita métodos comparativos para a predição de mRNAs alvos, potencial de codificação e a elucidação da estrutura secundária (WRIGHT et al., 2014). Um sRNA homólogo deve ser conservado não apenas na sua sequência, mas também quanto à sua estrutura e, para um dado conjunto de sRNAs homólogos, a importância da estrutura secundária tende a aumentar conforme diminui a conservação da sequência (NAWROCKI; EDDY, 2013b). Portanto, os algoritmos mais atuais para pesquisa de sRNAs homólogos consideram tanto a conservação da sequência primária de nucleotídeos, quanto a estrutura

secundária formada. Como padrão, eles utilizam um modelo probabilístico baseado em gramáticas livres de contexto de perfis estocásticos (DAI, 2007). Atualmente, os principais *softwares* que desempenham a função de pesquisa de sRNAs homólogos são o RNAlien (EGGENHOFER; HOFACKER; HÖNER ZU SIEDERDISSEN, 2016), INFERNAL (*INFERENCE of RNA Alignment*) (NAWROCKI; EDDY, 2013a) e GLASSgo (GLobal Automated sRNA Search go) (LOTT et al., 2018).

A predição de mRNA alvos, mesmo quando são considerados fatores como homólogos, conservação e estrutura dos sRNAs, pode resultar em alvos que não informam adequadamente sobre a natureza da função biológica do sRNA. Assim, a confecção de uma rede de interação entre os alvos preditos, seguida de enriquecimento funcional, pode revelar funções biológicas ocultas. Uma rede de proteínas de conectividade funcional é formada a partir da montagem de todas as associações funcionais de proteínas conhecidas e previstas para um dado organismo (SZKLARCZYK et al., 2017). Essas redes representam um nível crucial e intermediário de agregação de informações: elas são colocadas em bancos de dados em um extremo (que fornecem detalhes mecanicistas, mas geralmente têm baixa cobertura) e descobertas de interações experimentais de alto rendimento (que têm alta cobertura, mas geralmente também altos níveis de falsos positivos). Assim, as redes de proteínas são adequadas para servir de filtros para uma maior integração de dados, visualização e descoberta de funções moleculares ocultas (CUN; FRÖHLICH, 2013).

Nosso grupo, desde 2012, tem investido esforços no entendimento do papel de sRNAs e da proteína chaperona de RNA – Hfq na virulência de App (CRISPIM, 2014; PEREIRA et al., 2014; ROSSI et al., 2016; SILVA, 2016). Os resultados obtidos revelaram que *A. pleuropneumoniae* Δhfq é mais susceptível a diferentes condições de estresse e atenuado em *Galleria mellonella*, um hospedeiro alternativo para ensaios de virulência, o que nos mostrou evidências sobre o envolvimento de sRNAs e / ou da proteína Hfq na regulação da expressão genica em App.

Mais recentemente, nosso grupo conduziu um extenso estudo que identificou diferentes sRNAs em App. A partir do uso de quatro diferentes algoritmos foram identificados 23 sRNAs, sendo dezessete experimentalmente confirmados por Northern blotting ou RT-PCR e, posteriormente, por RNA-Seq. A maior parte dos sRNAs identificados não foi encontrada no banco de dado Rfam e mostraram-se conservados em outras espécies da família Pasteurellaceae. Apesar deste estudo inicial lançar luz sobre sRNAs em App, muito ainda necessita ser realizado no sentido de compreender a função desses sRNAs na virulência e fisiologia desta bactéria.

Portanto, faz-se necessário compreender o papel dos sRNAs de App e este trabalho busca esta compreensão por meio da obtenção e caracterização fenotípica de linhagens de App sorotipo 8 (MIDG2331) sRNA mutantes (Δ sRNA) e, assim, continuarmos nossa trajetória rumo ao entendimento do papel dos sRNAs em App, o que nos permitirá em um futuro próximo elaborar propostas vacinais baseadas em RNA.

HIPÓTESE

RNAs pequenos reguladores (sRNAs) estão envolvidos com a regulação do metabolismo e da virulência em *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

OBJETIVOS

Geral

Obter linhagens de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8 MIDG2331 mutantes para sRNA previamente identificados e caracterizar as linhagens obtidas.

Específicos

1. Obter e caracterizar linhagens *knockouts* de App MIDG2331 tipo selvagem e a isogênica mutante Δhfq , para os sRNAs originalmente identificados e validados por nosso grupo.
2. Avaliar a curva de crescimento e determinar a velocidade máxima de crescimento para as linhagens mutantes de App MIDG2331 obtidas.
3. Caracterizar o fenótipo das linhagens parentais e mutantes selecionadas de AppMIDG2331 quanto à aderência em superfícies biótica e abiótica.
4. Avaliar as linhagens parentais e mutantes selecionadas de App MIDG2331 quanto à resistência a agentes estressores e influência na alteração da concentração inibitória mínima de antibióticos.
5. Determinar a capacidade de causar hemólise para as linhagens parentais e mutantes selecionadas de App MIDG2331.
6. Avaliar a virulência *in vivo* das linhagens parentais e mutantes de App MIDG2331 no modelo alternativo *Galleria mellonella*.
7. Verificar nas linhagens parentais e mutantes selecionadas de *Actinobacillus*

pleuropneumoniae MIDG2331 a persistência *in vivo* no hospedeiro alternativo *Galleria mellonella*.

8. Predizer *in silico* os mRNAs alvos para os sRNAs investigados a partir do genoma de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8.
9. Verificar possíveis funções biológicas para os sRNAs investigados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das linhagens de *A. pleuropneumoniae* Δ sRNAs

Linhagens de *A. pleuropneumoniae* utilizadas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. Somente as linhagens de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 foram utilizadas na obtenção das linhagens sRNA mutantes. As linhagens de referência foram utilizadas como controles experimentais nas análises fenotípicas das linhagens mutantes.

Tabela 1. Linhagens de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizados neste trabalho.

Linhagem	Sorotipo	Genótipo/ Número de acesso	Tipo	Referência
MIDG2331	8	Selvagem (WT)/ GenBank: LN908249.1	Isolado clínico	(BOSSÉ et al., 2016)
MIDG2331- Δ hfq	8	Linhagem isogênica com a deleção do gene <i>hfq</i>	Isolado clínico	(CRISPIM, 2014)
L20	5b	Selvagem (WT)/ GenBank: NC_009053.1	Referência	(FOOTE et al., 2008)
Shope 4074	1	Selvagem (WT)/ GenBank: NZ_CP029003.1	Referência	(XU et al., 2010)

Todas as linhagens de *A. pleuropneumoniae* foram cultivadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion – Becton Dickinson) suplementado com Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD – 10 μ g.ml⁻¹ – Sigma Aldrich) a 37 °C por 24 horas em atmosfera gasosa de CO₂ a 5% ou em 10 mL de caldo BHI suplementado com NAD (10 μ g.ml⁻¹) com agitação orbital contínua de 180 rpm pelo tempo indicado para cada experimento.

Sequências de sRNAs utilizadas para a construção dos cassetes de DNA de inativação

As sequências de DNA correspondentes aos sRNAs *trans* previamente identificados em *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 5b e validados em App MIDG2331 (ROSSI et al., 2016) estão listados abaixo (Tabela 2). Os sRNAs identificados como ARRC (*Actinobacillus* RNA Regulatory Candidate) foram previamente identificados por análises *in silico* e confirmados por RT-PCR e *Northern blotting* (ROSSI et al., 2016) e os sRNAs identificados como RNA foram identificados por coIP/RNAseq (ROSSI, 2015). A expressão de todos os sRNAs listados na Tabela 3 foi confirmada por RNAseq e as análises foram conduzidas em réplicas biológicas (dados não mostrados).

A organização dos genes que codificam sRNAs previamente identificados e investigados neste trabalho foi feita manualmente com auxílio do programa Artemis (CARVER et al., 2012). O programa PATLOC (MRAZEK; XIE, 2006) foi usado para a confirmação da possível região promotora e o programa TransTermHP (KINGSFORD; AYANBULE; SALZBERG, 2007) para a pesquisa da região terminadora independente de Rho, esperada na organização gênica dos sRNAs *trans*. A estrutura secundária de cada sRNA foi predita a partir do programa RNAFold (LORENZ et al., 2011), pertencente ao pacote ViennaRNA 2.0. Todas as sequências dos sRNAs foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados RFAM (KALVARI et al., 2018) utilizando o sistema de pesquisa disponibilizado pelo banco de dados.

Tabela 2. sRNAs estudados neste trabalho para a obtenção dos cassetes de DNA de inativação.

ID	Localização no genoma*	Tamanho (pb)	RFAM	Fita	Genes flanqueantes	
					Upstream	Downstream
Arrc01	149356..149528	173	GcvB. RF00022 e-value 2,3e-22	-	MIDG2331_00135 GTPase	<i>gcvA</i>
Arrc02	418172..418415	243	nd	+	<i>grpE</i>	<i>potD2</i>
Arrc05	760650..760819	169	Moco RNA RF01055 e-value 7,2e-13	-	<i>torZ</i>	<i>torY</i>
Arrc07	1279204..1279310	106	Gli Riboswitch RF00504 e-value 4,7e-14	-	MIDG2331_01167 Na+/alanina simporter	MIDG2331_01169 Proteína de membrana
Arrc11	211911..212082	171	TPP Riboswitch RF00059 e-value 7,2e-13	+	<i>sixA</i>	MIDG2331_00196 Desidrogenase
Arrc14	451949..452117	163	nd	+	MIDG2331_00410 Hidrolase da super-família HAD	<i>leuA</i>
Arrc16	1710971..1711121	151	nd	+	MIDG2331_01618 Proteína hipotética	<i>tyrS</i>
Arrc18	2156709..2156866	158	nd	+	MIDG2331_02089 Glicosiltransferase	<i>accB</i>
Arrc20	351232..351540	309	nd	+	<i>moeB_2</i>	<i>rumA</i>
RNA01	738604..738689	86	nd	-	<i>sbcB</i>	<i>ericC</i>
RNA02	662472..662552	81	nd	+	MIDG2331_00602 Lipoproteína	MIDG2331_00603 Transposase
RNA04	358279..358387	109	nd	+	<i>rluA_2</i>	<i>ampD</i>
RNA10	1996007..1996146	139	nd	+	<i>nusG</i>	<i>rplK</i>
RNA12	2292548..2292718	171	nd	+	<i>comF</i>	<i>rsmC</i>

* MIDG2331 GenBank: LN908249.1

nd= sequência desconhecida, não foi encontrada no banco de dados Rfam.

Obtenção dos cassetes de DNA utilizados para interromper os genes sRNAs

Para a obtenção das linhagens de *A. pleuropneumoniae* sRNAs mutantes (Δ sRNAs) os cassetes de inativação foram desenhados com auxílio do programa MacVector (www.macvector.com) e a síntese foi realizada pela Eurofins Genomics. Na Figura 3 está descrito a estratégia de construção do cassete de inativação do sRNA

GcvB, utilizada para a obtenção dos cassetes de inativação dos demais sRNAs investigados neste trabalho.

Os cassetes de DNA clonados no vetor pEX-2A (Eurofins Genomics) foram usados para transformar *Escherichia coli* DH5 α ultracompetentes de acordo com o método descrito por Inoue, em 1990, (IM, 2011) para preparação e transformação de células de *Escherichia coli* DH5 α ultracompetentes. Os plasmídeos contendo o cassete foram extraídos com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante e linearizados por digestão com a endonuclease *NotI* (Promega). Os vetores linearizados foram usados para transformar naturalmente as linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT e Δ hfq.

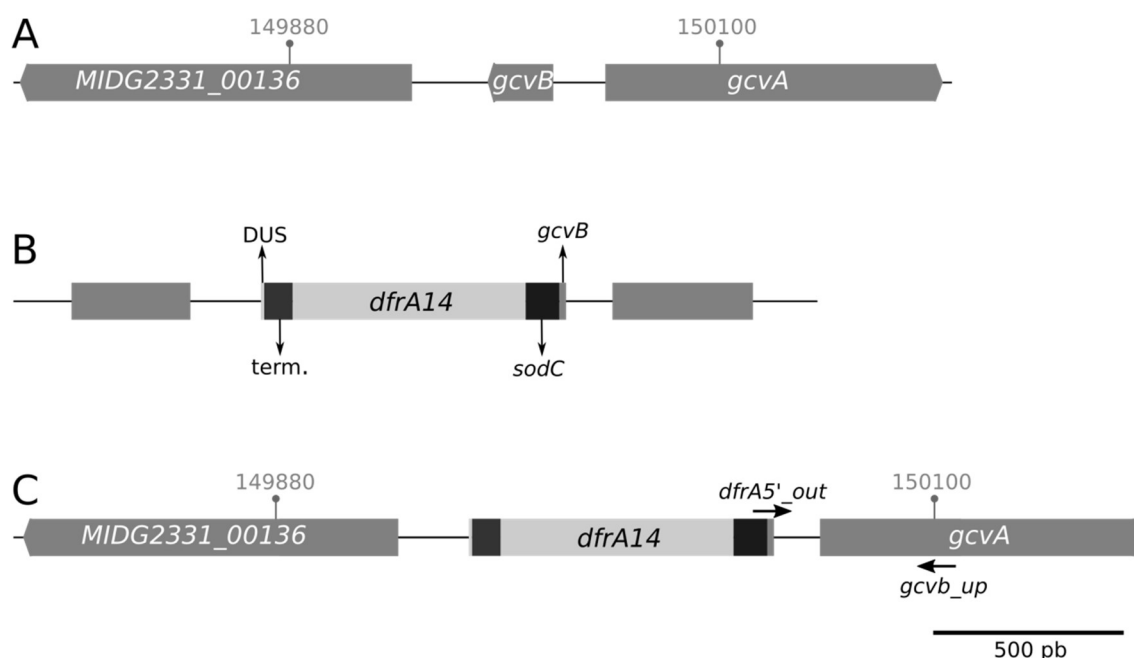


Figura 3. Estratégia de obtenção da linhagem *A. pleuropneumoniae* MIDG2331 Δ gcvB. (A) O gene *gcvB* de ambas as linhagens MIDG2331 WT (GenBank LN908249.1) e MIDG2331 Δ hfq foram substituídos (exceto as 15 primeiras bases) por um (B) cassete contendo o gene de resistência a trimetoprim *dfrA14* proveniente do plasmídeo pM3389T (BOSSÉ et al., 2015) sobre controle do promotor *sodC* de *A. pleuropneumoniae* (BOSSÉ et al., 2009) na qual foi introduzida uma sequência de 9 bases (5'ACAAGCGGT3') denominada DUS (DNA uptake system), requerida para a transformação natural de *A. pleuropneumoniae* (BOSSÉ et al., 2004). O cassete obtido foi flanqueado por sequências de 500 bases localizadas *upstream* e *downstream* ao gene *gcvB* e clonado no vetor pEX-2A. A confirmação dos transformantes (C) foi realizada por PCR com os primers *gcvb_up* e *dfrA5'_out*. A mesma estratégia foi utilizada para a construção das linhagens mutantes para os sRNAs descritos na tabela 1.

Obtenção e confirmação das linhagens App Δ sRNAs

As linhagens de App MIDG2331 WT e Δhfq foram transformadas com os cassetes de inativação específicos para cada sRNA investigado (Figura 3). O procedimento de transformação foi realizado de acordo com BOSSÉ et al. (2014). Os transformantes foram selecionados em BHI-NAD contendo 10 μ g/mL de Trimetoprim (Sigma Aldrich T7883). A confirmação dos mutantes foi feita por PCR utilizando os *primers* listados na Tabela 3, que foram desenhados de forma que somente haverá produção de amplicons se a linhagem for mutante, uma vez que são utilizados *primers* que anelam no gene *dfrA14*, que codifica resistência a trimetoprim (BOSSÉ et al., 2015a), e na sequência *upstream* ao cassete de inativação utilizado.

Tabela 3. *Primers* utilizados para a confirmação das linhagens Δ sRNAs.

Primer	Sequência (5'→ 3')
GcvB_up	GTTTGGTAATCGGATGATCTCGC
ARRC02_up	GTAAAACCACGCTGATATGATTTGC
ARRC05_up	TTGTATAACTTGGCGATGGCAC
ARRC07_up	AACCTTCCGCATATTTGGTGC
ARRC11_up	CTTTTCATCGGCGGTATTTTAACG
ARRC14_up	CGTTAGAGGTAATGAGCATCGC
ARRC16_up	CATCCGCTTCTAACGCAACAG
ARRC18_up	ATTAAGTTACCCGTTCCATGCG
ARRC20_up	TCGTTGTCAAACCTTGCAGCG
RNA01_up	TGCCGTTAGCTTAGTGAGATTC
RNA02_up	TCTTGTGCCGTATTATTAACCGC
RNA04_up	ACACCGTTTGGATATGGCAACC
RNA10_up	TGGTGAAGTATTAGTACCGACCG
RNA12_up	GGTTGAGATATTGAAACGGAGC
dfrA_5'out	CACGGTTCTCATCCTAATTCCTCC

Investigação da natureza não polar dos transformantes

Para verificar se os genes *downstream* e *upstream* aos sRNAs *trans* nocauteados foram afetados pela inserção do cassete de inativação (duplo evento de recombinação homóloga) foi investigada a natureza não polar das alterações. As linhagens transformantes foram crescidas conforme descrito anteriormente, mas em meio suplementado de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de trimetoprim e a partir destas o RNA total de cada linhagem parental ou transformante foi obtido utilizando o kit comercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen) utilizando as recomendações de uso de acordo com o fabricante. A concentração e qualidade do RNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% acrescido de Brometo de Etídio 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ seguido de visualização e registro em fotodocumentador (L-pix Loccus Biotecnologia) e por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). O RNA extraído foi submetido ao tratamento com TURBO DNase AM2238 (ThermoFisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante, para eliminação de qualquer DNA contaminante. A seguir, utilizou-se kit IMPROM-II™ Reverse Transcription System (Promega) para a obtenção do cDNA. A expressão dos genes *downstream* e *upstream* (Tabela 1) aos sRNAs *trans* foi investigada por PCR utilizando-se *primers* desenhados (Tabela 4) para cada gene a partir dos cDNAs obtidos pela reação da transcriptase reversa. RNA total das linhagens parentais e DNA genômico das mesmas foram utilizados como controle das reações. O gene que codifica para o RNA ribossomal 5S foi utilizado como controle endógeno da expressão gênica.

Tabela 4. *Primers* utilizados na análise da natureza não polar das linhagens Δ sRNAs obtidas.

ID	Genes flanqueantes	Oligonome	Sequência (5'→3')
Arrc01 (GcvB)	MIDG2331_00135	<i>gcvA_for</i>	CGCAGTCAGTCACCAAATCAAG
		<i>gcvA_rev</i>	TTGCCCGAACCGTAATAAATCG
	<i>gcvA</i>	<i>0135_for</i>	GTTACTCGCCATGCCAAACAC
		<i>0135_rev</i>	GCAGACAGACAAAGGGTTTCATAAC
Arrc14	MIDG2331_00410	<i>0410_for</i>	AAGTCAATGTTAATGAAGCGATGC
		<i>0410_rev</i>	CCCGTGGTGTTTGCTGAAATC
	<i>leuA</i>	<i>leuA_for</i>	GCTCAACACATTA AAAACAGCCG
		<i>leuA_rev</i>	ACAGTAACCGACCGTATCCG
Arrc16	MIDG2331_01618	<i>01618_for</i>	GTTCGCTTGACTTCGTCCG
		<i>01618_rev</i>	ATAGGTGACTTCAAACGAGTACC
	<i>tyrS</i>	<i>tyrS_for</i>	TCCTCCGCTTACTCGTGAAG
		<i>tyrS_rev</i>	GTACCGCCTAACTCAACATCC
RNA01	<i>sbcB</i>	<i>sbcB_for</i>	ACGATGAAATGACCCGTTATACC
		<i>sbcB_rev</i>	CTTGATTTTGATTAGTTGGGTGCC
	<i>eriC</i>	<i>eriC_for</i>	AAGTGCAAACGAGCTTATGGC
		<i>eriC_rev</i>	GCACACCACACCGCATAATG
RNA02	MIDG2331_00602	<i>0602_for</i>	TCTTGTGCCGTATTATTAACCGC
		<i>0602_rev</i>	CTTGCTCGGAAGTCGTTCTTG
	MIDG2331_00603	<i>0603_for</i>	GTGAAGTGGGTAAAATTGCCGAG
		<i>0603_rev</i>	CTCAGCATGTCTTGATAGTCTGC
RNA04	<i>rluA_2</i>	<i>rluA2_for</i>	ATATCATCCTCCGCTTGAACCG
		<i>rluA2_rev</i>	ACCTTTTCGCCTAATTTGCC
	<i>ampD</i>	<i>ampD_for</i>	ACTTTAACGCTCGCCCGATAG
		<i>ampD_rev</i>	GATATTCCGTCATCAGTGCTTGAG

Caracterização fenotípica das linhagens de App Δ sRNAs

Determinação e análise das curvas de crescimento

As curvas de crescimento das linhagens parentais e Δ sRNAs foram feitas em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (KASVI® k12-096). Inicialmente, as linhagens foram incubadas por 12 horas a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5% em meio BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim 10 µg.mL⁻¹. Uma suspensão de células DO₆₀₀ 0,01 (200 µL) correspondente a cada linhagem foi transferida para poços da placa de poliestireno e incubados em espectrofotômetro Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) a 37 °C por 24 horas e leitura a cada 15 minutos. As placas foram mecanicamente agitadas por cinco minutos contínuos antes de

cada leitura. Os dados obtidos a partir de três repetições biológicas com seis replicatas cada foram utilizados para estimar a velocidade máxima de crescimento (μ_{\max}), tempo de fase Lag, crescimento máximo (DO_{600}) e população total. Os dados foram submetidos à regressão não linear do tipo sigmóide utilizando modelo de Weibull (LONGHI et al., 2017). A μ_{\max} foi determinada como sendo a tangente do ponto de inflexão obtido pelo modelo de Weibull. A fase Lag foi obtida calculando-se o ponto de intersecção da tangente do ponto de inflexão com o eixo ordenado (tempo de incubação). O crescimento máximo foi obtido pela equação do modelo de Weibull. A população total foi determinada por meio da integral da área sob a curva dentro dos limites 0 e 24 horas. As médias de cada atributo foram submetidos a ANOVA utilizando *software* R com nível de significância de 5% de probabilidade.

Adesão em superfície abiótica

A análise da adesão das linhagens parentais e Δ sRNAs em superfície abiótica foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (KASVI® k12-096) a partir da metodologia proposta por O'TOOLE (2011), com pequenas alterações. As linhagens bacterianas analisadas foram incubadas por 12 horas a 37 °C em atmosfera de CO₂ de 5% em meio BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após o crescimento uma amostra de cada cultura foi transferida assepticamente para meio BHI-NAD e a densidade óptica ajustada para 0,01. A suspensão foi gentilmente homogeneizada e 200 μL foram transferidos para poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. A seguir, a placa foi lavada vigorosamente com água deionizada e o excesso de água descartado invertendo-se a placa sob pilha de papel toalha. A placa foi seca em estufa a 37 °C durante 30 minutos seguido da adição de 250 μL de uma solução de cristal violeta 0,1% em cada poço e incubação por 10 minutos à

temperatura ambiente. A solução de cristal violeta foi descartado submergindo a placa por duas vezes em recipiente com água deionizada e o excesso de água foi descartado conforme descrito acima. A placa foi seca a 37 °C por duas horas e a seguir foram adicionados 250 µL de ácido acético 30% em cada poço da placa seguido de incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi cuidadosamente transferido para uma nova placa e realizada a leitura em espectrofotômetro Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) a 590nm utilizando solução de ácido acético 30% como branco. A média a partir de três repetições biológicas com quatro replicatas cada foi obtida e os dados submetidos a ANOVA utilizando *software* R com nível de significância de 5% de probabilidade.

Adesão em superfície biótica

As análises de adesão das linhagens parentais e Δ sRNAs em superfície biótica foram realizadas em células epiteliais de rim de suínos, PK15 (ATCC® CCL-33™) gentilmente cedidas pelo prof. Abelardo Silva Júnior (Departamento de Veterinária, UFV). As análises foram realizadas em placas de poliestireno de 24 poços com fundo chato (KASVI® k12-024).

Preparo das células PK15

Uma garrafa de 25 cm² contendo células PK15 na 14^a passagem, com 48 horas de crescimento e monocamada já formada foi tripsinizada com 1 mL de TrypLE™ Express (Gibco) por 2 minutos a 37 °C. A tripsina foi retirada e as células descoladas e suspensas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium. Merck) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino – SFB (Gibco) para se obter uma concentração de 1,5x10⁵ células/mL em um volume final de 12 mL. A seguir, 500 µL da suspensão de células foi adicionado para cada poço da microplaca e incubadas a 37 °C em atmosfera de CO₂ de 5% por 48 horas.

Preparo das linhagens de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

As linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e Δ sRNAs foram incubadas por 12 horas a 37 °C e atmosfera de CO₂ de 5% em meio BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim 10 µg.mL⁻¹. Uma alíquota de cada linhagem foi suspensa em 10 mL de caldo BHI-NAD para se obter DO₆₀₀ de 0,01. A seguir, a suspensão foi incubada em banho Maria a 37 °C e 180 rpm até se obter crescimento correspondente ao meio da fase exponencial de cada linhagem, previamente determinado. Nos ensaios de adesão foi padronizado o uso de uma população de células (UFC) de 3,0x10⁷ células/mL.

Infecção de células PK15 com *Actinobacillus pleuropneumoniae*

O meio DMEM de cada poço da placa de 24 orifícios foi retirado com auxílio de uma pipeta e em seguida acrescentado 450 µL de DMEM suplementado com SFB 5%. A seguir foram adicionados 50 µL da suspensão das linhagens de App MIDG2331 WT ou Δ sRNAs, preparada conforme descrito acima. A placa foi incubada a 37 °C em atmosfera de CO₂ de 5% por 3 horas. Em seguida, o meio de cada poço foi retirado por sucção e a monocamada de células PK15 foi lavada três vezes com 500 µL de PBS estéril em cada lavagem. A monocamada de cada poço foi tripsinizada com 1 mL de TrypLE™ Express (Gibco) por 2 minutos a 37 °C para liberação das células PK15 aderidas. A seguir, 400 µL de PBS esterilizado acrescido de SFB 10% foram adicionados em cada poço seguido da diluição seriada da suspensão de células até 10⁻⁷ em PBS. A determinação do número de células bacterianas aderidas nas células PK15 foi realizada por plaqueamento de uma alíquota de 10 uL de cada diluição em ágar BHI-NAD seguido de incubação a 37 °C em atmosfera de CO₂ de 5% por 24 horas. A média a partir de três repetições biológicas com três replicatas experimentais foi obtida e os

dados submetidos a ANOVA utilizando *software* R com nível de significância de 5% de probabilidade. Os dados foram expressos como porcentagem de adesão em relação à linhagem de App MIDG2331 WT.

Análise microscópica

Para a visualização do processo de adesão das células bacterianas em PK15, os procedimentos descritos acima foram repetidos exceto no aspecto em que a monocamada de células foi formada sobre uma lamínula estéril de 12 mm de diâmetro (Vidrobras), cuidadosamente depositada no fundo dos poços da placa. Após a adição das linhagens bacterianas à monocamada celular e incubação por três horas, as lamínulas de cada poço foram cuidadosamente retiradas e lavadas em PBS estéril por três vezes seguido da imersão das lamínulas em Metanol PA (MERCK) por um minuto. A seguir as lamínulas foram imersas em solução de Giemsa (Sigma-Aldrich) por 30 minutos. O excesso de corante foi retirado imergindo as lamínulas em água destilada. As lamínulas foram secas ao ar e analisadas por microscopia óptica em microscópio Olympus CX31 utilizando a objetiva de 100x (aumento final de 1000 vezes).

Sensibilidade a agentes estressores e a antibióticos

A sensibilidade das linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e Δ sRNA em diferentes condições de estresse foi analisada por meio do cultivo na presença de cloreto de potássio 0,1 M (estresse osmótico), peróxido de hidrogênio 0,2 mM (estresse oxidativo) e à temperatura de 42 °C (estresse térmico). Os ensaios foram realizados a partir de linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e Δ sRNAs incubadas por 12 horas a 37 °C em atmosfera de CO₂ a 5% em meio BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim 10 μ g.mL⁻¹. Uma alíquota de cada linhagem foi suspensa em 10 mL de

caldo BHI-NAD para se obter uma DO_{600} de 0,01. A seguir a suspensão foi incubada em banho Maria a 37 °C e 180 rpm até se obter crescimento correspondente à metade da fase exponencial de cada linhagem. A suspensão de células bacterianas de cada linhagem foi ajustada para uma DO_{600} de 1,0 e em seguida diluídas serialmente até 10^{-7} . Uma alíquota de 10 μ L de cada diluição foi aplicada em triplicata em placas quadradas (Greiner Bio-one: 688102) contendo meio BHI-NAD acrescido ou não do agente estressor. As placas foram incubadas a 37 ou 42 °C por 24 horas em atmosfera de CO_2 de 5%. O experimento foi realizado em triplicata biológica com três repetições experimentais cada.

A sensibilidade das linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e Δ sRNAs a antibióticos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo descrito por ELSHIKH et al. (2016) com algumas modificações, o qual está em conformidade com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* – Document M31-A3 (CLSI, 2009). Foram investigados os antibióticos ampicilina e tilosina e o esquema de inoculação está ilustrado na Figura 4. Brevemente, as linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e Δ sRNAs foram incubadas por 12 horas a 37 °C em atmosfera de CO_2 a 5% em meio BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim 10 μ g.mL⁻¹. A seguir, uma alíquota de cada linhagem foi suspensa em 10 mL de caldo BHI-NAD para se obter uma DO_{600} de 0,01 e esta suspensão foi incubada em banho Maria a 37 °C e 180 rpm até se obter crescimento correspondente ao meio da fase exponencial de cada linhagem. A suspensão de células bacterianas de cada linhagem foi ajustada para uma DO_{600} de 0,5 e em seguida diluída 100 vezes em caldo BHI-NAD, obtendo-se uma concentração final de 1×10^6 UFC.mL⁻¹. As microplacas foram preparadas adicionando-se 100 μ L de caldo BHI-NAD em cada poço. A seguir foram adicionados 100 μ L de solução de antibiótico, nas concentrações previamente definidas, na linha A de cada

microplaca, conforme ilustrado na Figura 4. Em seguida foram realizadas diluições seriadas (base 2) dos antibióticos seguindo até a linha F da microplaca. Após a diluição seriada, 100 μL de inóculo bacteriano a 1×10^6 $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ foram adicionados em cada poço. A microplaca foi então incubada durante 24 horas a 37 °C. Para a avaliação dos resultados, 50 μL de resazurina (0,01%) foram adicionados em cada poço e a placa foi novamente incubada durante uma hora a 37 °C. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antibiótico foi considerada como sendo a menor diluição em que não houve redução da resazurina (mudança de azul para rosa). Como controle positivo foi utilizado o antibiótico florfenicol (4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e como controle negativo foi utilizado caldo BHI-NAD sem adição de antibiótico. As análises foram realizadas em triplicata biológica com três repetições técnicas cada.

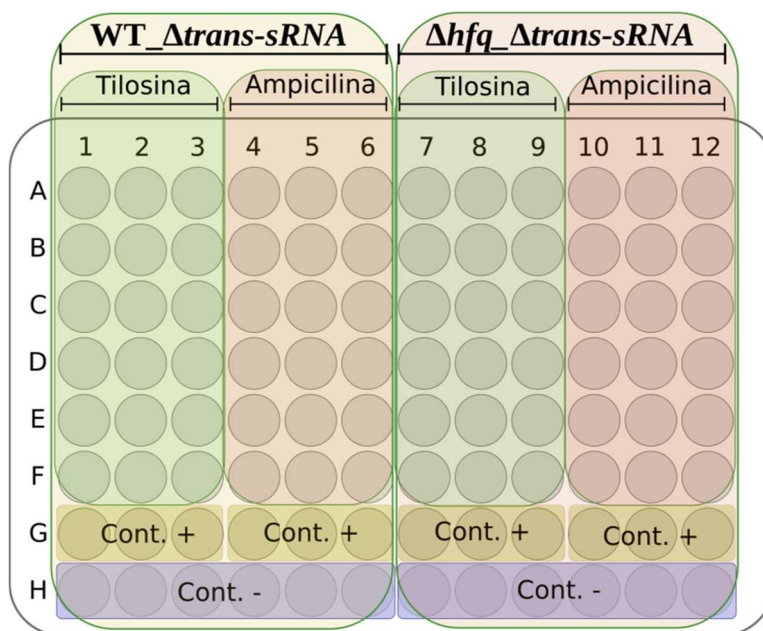


Figura 4. Organização da microplaca para análise da sensibilidade a antibióticos por linhagens de *App* parentais e ΔsRNAs . Cont. + (controle positivo): meio de cultura acrescido de florfenicol 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Cont. - (controle negativo): Somente meio de cultura.

Análise da capacidade hemolítica

A análise da atividade hemolítica foi realizada utilizando eritrócitos de carneiro (Ebefarma) a partir de uma adaptação da metodologia descrita por (SHIN; KANG; HAHM, 1999). Brevemente, linhagens parentais e Δ sRNAs foram incubadas em caldo BHI com uma DO₆₀₀ inicial de 0,01 e mantidas a 37 °C e 180 rpm até se obter uma DO₆₀₀ de 3.0 (final da fase exponencial). A seguir, uma alíquota de 5 mL foi coletada e centrifugada a 5.000 g por 2 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em tampão PBS filtrado, novamente centrifugado e o sedimento final ressuspensionado em tampão PBS para uma DO₆₀₀ de 2,0. Uma amostra de 0,75 mL da suspensão de bactérias foi adicionada a igual volume de solução de eritrócitos de carneiro a 1% (1:1) e incubados por uma hora à temperatura ambiente com agitação rotativa vertical de 6 rpm. A seguir, cada amostra foi centrifugada por 5 minutos a 1.000 g e a absorvância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro (ThermoFisher Scientific) a 404 nm. Os valores de 0% e 100% foram medidos utilizando suspensão de hemácias suspensas em PBS filtrado ou 1% de Tween 20, respectivamente. A hemólise foi calculada relativa à hemólise total causada pelo Tween 20 de acordo com a seguinte fórmula: Hemólise (%) = $\{[(ABS_{amostra} - ABS_{PBS}) / (ABS_{Tween20} - ABS_{PBS})] \times 100\}$. As médias a partir de três repetições biológicas com três replicatas experimentais cada foram analisadas por teste ANOVA utilizando *software* R com nível de significância de 5% de probabilidade.

Análise da virulência no modelo alternativo *Galleria mellonella*

As larvas de *Galleria mellonella* (Lepdoptera: *Pyralidae*) utilizadas no experimento foram mantidas no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Bioagro, UFV em sistema contínuo de produção. Os experimentos foram realizados de acordo com a

metodologia descrita por PEREIRA et al. (2014). Todos os testes foram realizados com triplicatas biológicas e experimentais (n=10 lagartas por replicata experimental). As curvas de sobrevivência foram plotadas utilizando o método de Kaplan-Meier (BLAND; ALTMAN, 1998) e as diferenças na sobrevivência foram calculadas pelo teste de log-rank, com nível de significância de 1% de probabilidade com auxílio do *software* GNUMERIC[©] (GNU General Public License).

Análise da colonização da linhagem Δ rna01 em *Galleria mellonella*

O monitoramento da persistência das linhagens parentais e WT_ Δ rna01 em lagartas de *G. mellonella* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por PEREIRA et al., (2014). Brevemente, linhagens de bactérias foram inoculadas na hemocele das lagartas (10^4 UFC.lagarta⁻¹) e amostras de hemolinfa foram coletadas assepticamente em tubos previamente siliconados utilizando Sigmacote[®] (Sigma-Aldrich SL21) nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a infecção, e esta foi submetida à diluição seriada e plaqueadas em ágar BHI-NAD. A confirmação da identidade das colônias foi feita a partir de PCR de colônias utilizando os primers correspondentes ao gene *apxIVa* (*apxIVa_F*: 5'GCCTCCGACCTGAATAAACC3' e *apxIVa_R*: 5'CAACCATCTTCTCCACC3'), utilizando a enzima Go Taq DNA polimerase (Promega, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram realizadas três repetições biológicas.

Análises *in silico*

As análises *in silico* foram desenvolvidas para os sRNAs GcvB, RNA01, RNA02, RNA04, Arrc14 e Arrc16 seguindo o fluxo de trabalho ilustrado na Figura 5. As sequências de cada sRNA estão listadas na Tabela 5 e as ferramentas e recursos computacionais utilizados estão descritos na Tabela 6.

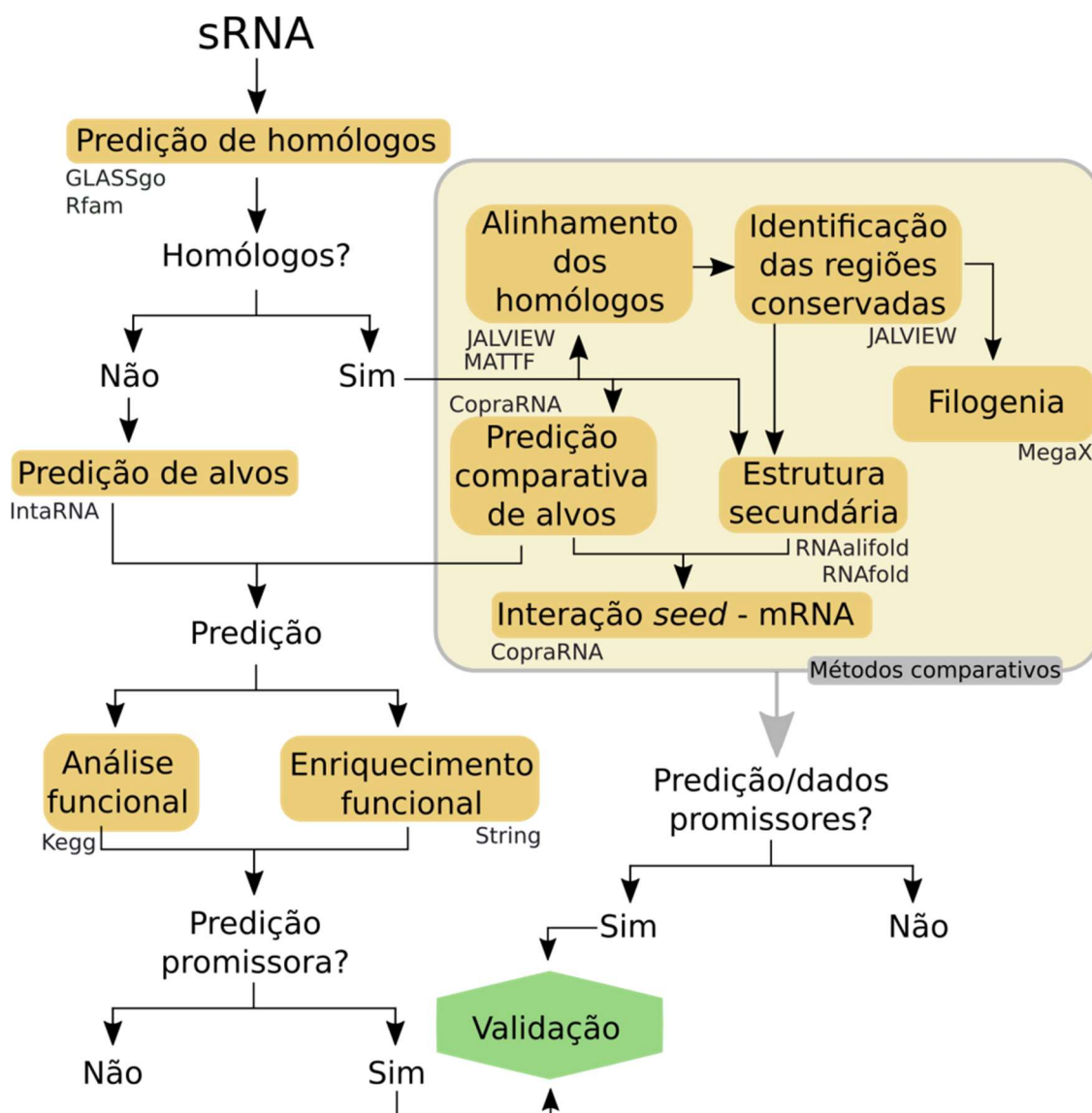


Figura 5. Pipeline utilizada para a análise *in silico* dos sRNAs e seus respectivos alvos.

Tabela 5. Sequência dos sRNAs e *locus* gênico no genoma de App MIDG2331 (Genbank: LN908249.1) utilizados nas análises *in silico*. As regiões palindrômicas terminadoras estão anotadas em negrito com fundo cinza.

sRNA	Locus	Sequência (5' > 3')
Arrc01 (GcvB)	149356..149528	AGTTTCCGAATTATTACGGTAAATTCAGCTATTTTCAGATTTTAAAGTATGATGTTGTGT TTGCATATTGGTCTAGGAAACTAGACTGGAGTAACATCAAGTTACTCGTTTCACTTCC TGTATATTTTAAACCTTTTGGTTTAT AACCGTCCATTTGGACGGT TTTTTCGT
RNA01	738604..738689	GCTAACTGACAGAATTTATGTAAGTTTTTTTCATTTCCTTAGTAAGACCTCCC CCGG CATCGCTTCTTGGTGCCGGG TTTTTTT
RNA02	662472..662552	ACTTAATAAAAAAGTGTGTGTACAGCAACCGATTTCATAAATTTGCTTCCGAGT AG CCCCTAAGTTGAGGGGCT TTTTTTT
RNA04	358279..358387	CGTCTATGACAAACCACCTTGTTATAGAACGGGTCATCATCCAAATGACTTAGAA AATTTTATTCATTCCTAATATAT GGCTAGGATTTATTCCTAGCC GTTTTTT
Arrc14	451949..452117	CGTATTTCAAATAACTATGCAAACATAAACACACACAACATAATGGAAAAACGACTA TCTCTCGACTGCTTCTGTTATCGCATTTCGTGCGAGGATAAAGGTCGTTCCGGAGTG AAAGCGTTCACTATCCACACTTTG CCCGCACATTGATGCGGG TTTTTTTACTTA
Arrc16	1710971..1711121	GCACAAATGATAAAGATTCTCATTGTAAGAATTTGTAAAGGCACTTGCTTATAAAGA TGAGAATTATTATCATAAATCACTTCAAAAAATAATAGGTAATCACTCCAACCTCTTA CGCCTCATTCCCCACAAAATGAGGCG TTTTTTT

Tabela 6. Ferramentas e recursos computacionais utilizados nas análises *in silico*.

Nome	Descrição	Endereço
GLASSgo	Servidor para a detecção de sRNAs homólogos	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/GLASSgo/Input.jsp
Rfam versão 13.0	Banco de dados de famílias de RNA	http://rfam.org/
IntaRNA	Servidor para a predição de alvos de sRNAs para organismos simples	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp
CopraRNA	Servidor para a predição de alvos para sRNAs homólogos	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CopraRNA/Input.jsp
MAFFT versão 7.0	Ferramenta para alinhamento de sequências múltiplas	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/
JALVIEW versão 2.10.4	<i>Software suite</i> para visualização, análise e edição de alinhamentos	http://www.jalview.org/
RNAfold versão 2.4.6	Ferramenta para predição de estruturas secundárias de fitas simples de RNA ou DNA	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi
RNAalifold	Ferramenta para predição de estruturas secundárias conservadas de RNA ou DNA	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi
KEGG	Coleção de banco de dados de funções moleculares de genes	https://www.genome.jp/kegg/ko.html
ORTHOLOGY	Banco de dados integrado de interações proteínas – proteínas preditas e conhecidas	https://string-db.org/
STRING versão 10.5		
MEGAX versão 10.0.4	<i>Software suite</i> para análise de sequências de DNA e proteínas	https://www.megasoftware.net/
iTOL	Ferramenta <i>on line</i> para anotação e gerenciamento de árvores filogenéticas.	https://itol.embl.de/

Pesquisa de sRNAs homólogos

Os sRNAs homólogos foram pesquisados com auxílio do software GLASSgo, que é parte do *Freiburg RNA Tools* e disponibiliza o acesso via servidor web (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/GLASSgo/Input.jsp>). GLASSgo realiza uma pesquisa de baixa estringência no banco de dados NCBI e seleciona as regiões com identidade acima de 52%. Para aumentar a sensibilidade, uma nova pesquisa (BLASTP) com as regiões selecionadas é repetida pelo *software* a partir de diferentes níveis de identidade da sequência do sRNA. Esta análise é seguida de um filtro estrutural que avalia a estrutura secundária das sequências selecionadas. Os parâmetros utilizados para cada pesquisa foram os seguintes:

Seleção de taxon:	Domínio Bactéria
<i>E-value</i> máximo:	1
Identidade mínima:	52%
Agrupamento baseado na estrutura:	ativo
Filtro de estrutura:	Automático (2)

Análise da conservação dos sRNAs

A conservação dos sRNAs foi realizada por meio da pesquisa de regiões conservadas nos homólogos detectados. Inicialmente, a presença de falsos positivos nos homólogos de cada sRNA foi verificada realizando o alinhamento dos homólogos com o *software* MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (<https://ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft>). As sequências alinhadas dos homólogos para cada sRNA foram transferidas para o editor de alinhamentos JALVIEW onde foram identificadas as regiões que apresentaram sequências altamente conservadas (>80%). Estas regiões foram utilizadas para classificar os positivos verdadeiros e eliminar os falsos positivos. Os homólogos considerados verdadeiros foram realinhados utilizando

MAFFT e as regiões conservadas foram novamente definidas com auxílio do editor JALVIEW. Para evitar o peso excessivo causado por espécies com homólogos positivos com alto número de genomas sequenciados, foi selecionado um homólogo representante de cada espécie. Para realizar a seleção foi feito o agrupamento entre estes homólogos com a confecção de um dendograma baseado no agrupamento por UPGMA. A seguir, foram determinadas as sequências consenso e estruturas secundárias para os homólogos de cada sRNA, com auxílio do *software* RNAalifold, e a estrutura secundária para cada sRNA, com auxílio do *software* RNAfold.

Análise filogenética dos sRNAs

Para verificar a distribuição filogenética dos sRNAs dentro da família Pasteurellaceae, as sequências homólogas aos sRNAs foram analisadas pelo método de máxima verossimilhança, baseado no modelo *General Time Reversible* (NEI; KUMAR, 2000), aplicando-se um *bootstrap* de 5000 replicatas. As árvores geradas para as sequências homólogas de cada sRNA foram comparadas com árvores obtidas para as sequências 16S do DNA ribossomal das espécies onde os homólogos foram detectados. As análises foram conduzidas no *software* MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Predição dos mRNAs alvos

Os mRNAs alvos para cada sRNA selecionado foi predito avaliando-se cada gene anotado do genoma de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331 (Genbank: NZ_LN908249.1). Para a pesquisa foi utilizado o *software* CopraRNA (MANN; WRIGHT; BACKOFEN, 2017; WRIGHT et al., 2013), que realizou a predição a partir dos sRNAs com homólogos detectados. Para sRNAs sem homólogos em outras espécies

foi utilizado o *software* IntaRNA (WRIGHT et al., 2014). Os genes foram avaliados com uma extensão de até 200 nucleotídeos *upstream* e 100 *downstream*, uma região *seed* de no mínimo sete nucleotídeos e *p-value* menor ou igual a 0,01. Para efeito de comparação entre sequências de organismos geneticamente relacionados, foram selecionados os genomas de cinco homólogos distintos (Tabela 7) e comuns para todos os sRNAs estudados, determinados de acordo com a metodologia descrita para a pesquisa de homólogos.

As regiões de interação (*seed*) entre os mRNAs alvos preditos para cada sRNA foram utilizadas para a construção de gráficos de densidade de interação *seed* – mRNA, para os respectivos mRNAs e sRNAs. Os gráficos foram gerados para cada homólogo utilizando o *software* CopraRNA.

Tabela 7. sRNAs homólogos utilizados na predição de alvos para cada sRNAs.

GenBank	Homólogo	Identidade (%)*				
		GcvB	RNA01	RNA02	Arcc14	Arcc16
NC_010278	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> J3	98,9	100,0	100,0	100,0	88,2
NZ_CP007715	<i>Actinobacillus equuli</i>	78,2	92,2	92,8	83,0	86,3
NC_021743	<i>Mannheimia haemolytica</i>	75,4	71,3	72,0	67,3	77,4
NZ_CP006955	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	68,8	69,3	72,8	68,6	70,9

* Identidade em relação aos sRNAs de MIDG2331.

Anotação funcional dos mRNAs alvos preditos

A anotação funcional dos mRNAs alvos preditos para cada sRNA foi realizada por pesquisa manual no banco de dados KEGG Orthology (KO), o qual pertence ao banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KANEHISA et al., 2017; KANEHISA; GOTO, 2000). A busca foi realizada a partir do nome do gene (ID gene) ou *locus tag* de cada mRNA alvo anotado no genoma de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331 (NZ_LN908249.1). A nomenclatura utilizada nesta anotação foi comparada

com a nomenclatura utilizada em uma segunda anotação do genoma de MIDG2331, nomeada de LN908249.1. Na eventualidade de discrepância entre as duas anotações, foi realizado consulta na anotação em homólogos do gene em outros sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para definir a nomenclatura a ser utilizada. Os genes obtidos foram classificados até o terceiro nível hierárquico da tabela KO 0000 ou KO 0001 e os dois primeiros níveis hierárquicos da tabela KO foram utilizados na confecção dos gráficos.

Enriquecimento funcional

Com a finalidade de revelar processos biológicos e funções moleculares implicados nas interações sRNAs – mRNAs, foi realizado uma análise de enriquecimento funcional a partir da confecção de uma rede de interação genética entre os mRNAs alvos preditos para cada sRNA. Todos os alvos preditos foram analisados no *software* STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) (SZKLARCZYK et al., 2017) que utiliza dados de interação biológica dos alvos para a confecção da rede. As interações avaliadas foram as seguintes: (i) experimental – evidências experimentais de interação bioquímica, biofísica ou genética; (ii) banco de dados – evidência anotada por um *expert* e depositada em um banco de dados (p.ex: Kegg e NCBI); (iii) mineração de texto – menção da proteína em todos os artigos publicados no PUBMED (Pares de proteínas recebem uma pontuação de associação quando são freqüentemente mencionados juntos no mesmo artigo, resumo ou até sentença. A pontuação é aumentada quando existe um conceito linguístico que conecta duas proteínas, como *ligação* ou *fosforilado por*); (iv) Coexpressão – dados de expressão gênica são normalizados, lapidados e então correlacionados (pares de proteínas que são consistentemente similares em seus padrões de expressão, sob uma variedade de

condições, receberão um alto escore de associação); (v) vizinhança – genes consistentemente encontrados como vizinhos, como no caso de *operons* conservados e co-transcritos); (vi) fusão – pares de proteínas recebem um escore de associação quando há, pelo menos, um organismo em que seus respectivos ortólogos se fundiram em um único gene codificador de proteínas e; (vii) coocorrência – onde é avaliada a distribuição filogenética de ortólogos de todas as proteínas em um determinado organismo. Se duas proteínas apresentam alta similaridade nessa distribuição um escore de associação é atribuído.

Para realizar a análise foi utilizada a sequência de aminoácidos de cada mRNA alvo predito e comparado com as proteínas anotadas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (sorotipo 5b), uma vez que a anotação depositada no NCBI para *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331 não consta em alguns bancos de dados utilizados para a pesquisa pelo *software* STRING. A anotação funcional das sequências encontradas em *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20, com identidade acima de 90%, foi comparada com a anotação funcional de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331. Os alvos anotados como proteína hipotética, que apresentavam elevado escore de interação em região com estrutura secundária conservada no sRNA, foram comparados com proteínas homólogas anotadas para a bactéria *Escherichia coli*.

Para a confecção da rede genética de interação foi adotado uma pontuação de interação mínima de 0,400, de um escore que varia entre 0 e 1,0 (valor de confiança médio), de acordo com as recomendações de configuração do STRING. A rede foi desenhada de modo que a espessura da linha indique a força dos dados para suportar a interação. Os alvos (nós) desconectados foram omitidos da exibição da rede. O enriquecimento foi realizado respeitando-se um acréscimo de no máximo 5 nós para cada alvo originalmente predito. Alvos cuja predição mostrou-se promissora foram

enriquecidos individualmente com um acréscimo de no máximo 10 nós, utilizando as demais configurações descritas acima, para revelar processos e funções biológicas ocultos.

As designações de Ontologia de Genes (GO) (BATEMAN et al., 2017) para processos biológicos e funções moleculares foram plotadas de acordo com o módulo de \log_2 das taxas de detecção falsas (FDR). O valor de *p-value* obtido após o enriquecimento foi determinado por meio de teste Hipergeométrico (RIVALIS et al., 2007).

RESULTADOS

Obtenção das linhagens de App Δ sRNAs

Neste trabalho foram obtidas linhagens mutantes a partir das linhagens parentais MIDG2331 WT e Δhfq para 13 dos 14 sRNAs investigados e listados na Tabela 2. Não foi possível obter linhagens mutantes para o RNA10, pois o cassete de DNA obtido resulta na deleção de sequências importantes envolvendo parte da região promotora e TSS (*transcription start site*) do gene *rplK*, que codifica para a proteína L11 da subunidade ribossomal 50S, localizado *downstream* ao gene sRNA 10, o que resultou em um efeito letal. As linhagens mutantes obtidas para os sRNAs Arrc02, Arrc18 e RNA12 não foram incluídas neste estudo pois mesmo que tenham sido obtidas as linhagens mutantes correspondentes, a construção comprometeu a estrutura dos genes adjacentes aos sRNAs nocauteados (Tabela 2). O cassete de DNA utilizado para interrupção do gene *arrc02* removeu parte da região promotora e as 48 bases iniciais do gene *potD2* (que codifica para uma proteína de membrana de ligação a poliaminas), *downstream* ao gene *arrc02*, e a região promotora do gene *grpE* (que codifica para uma proteína envolvida na regulação em condições de choque térmico (*heat shock*), *upstream* ao gene *arrc02*). A proteína periplasmática codificada pelo gene *potD2* está envolvida na ligação e transporte de poliaminas e já foi demonstrado que a mesma é requerida para o crescimento ótimo de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 1 durante a fase exponencial, além de contribuir para a sua virulência (ZHU et al., 2017). O gene *grpE* codifica uma proteína que participa ativamente nas respostas a estresse osmótico e térmico, prevenindo a agregação das proteínas desnaturadas (CAMERON et al., 2012). A construção da linhagem $\Delta arrc18$ eliminou a região 5' UTR (Untranslated Region) do gene *accB*, que codifica para proteína carreadora de coxibiotina, a qual está envolvida com o metabolismo de

fosfolipídios (AUGER et al., 2009). Os sRNAs Arrc05, Arrc07 e Arrc11 não foram incluídos neste estudo por se tratarem dos *riboswitches* Moco_RNA (RF01055; *e-value* 6,6⁻¹⁷), Glicina (RF00504; *e-value* 4,7⁻¹⁴) e TPP (Tiamina pirofosfato) (RF00059; *e-value* 7,2⁻¹³) respectivamente. Moco_RNA *riboswitch* (localizado na região intergênica entre os genes *torZ* e *torY*), está envolvido no metabolismo do cofator molibdenium (REGULSKI et al., 2008). Glicina *riboswitch* está localizado *upstream* ao gene MIDG2331_01167, que codifica para um transportador *symporter* de sódio-alanina. Este *riboswitch* é amplamente distribuído no domínio Bacteria (KLADWANG; CHOU; DAS, 2011) e regula expressão de genes relacionados a biossíntese e clivagem de glicina (KAZANOV; VITRESCHAK; GELFAND, 2007) ou da expressão do transportador *symporter* sódio-alanina (MANDAL et al., 2004) TPP *riboswitch* é um sRNA altamente conservado e está organizado *upstream* ao gene *tpba*, o qual codifica para o transportador de tiamina. No caso do TPP *riboswitch* o ligante é a tiamina pirofosfato (RODIONOV et al., 2002; SERGANOV et al., 2006) e este controla genes envolvidos no transporte e/ou síntese de tiamina e seus derivados fosforilados (HALLER et al., 2013). A construção das linhagens *Δrna12* eliminou um outro provável sRNA, localizado *upstream* ao RNA12 e não identificado anteriormente (dados não mostrados). Portanto, os estudos relacionados a este sRNA não foram continuados.

O sRNA Arrc01 corresponde a GcvB (RF00022; *e-value* 2,3⁻²²), um sRNA bem conhecido e presente em diversas bactérias Gram-negativas. GcvB está envolvido na regulação de vários sistemas de transporte e de síntese de aminoácidos, principalmente os aromáticos (GULLIVER et al., 2018; MIYAKOSHI; CHAO; VOGEL, 2015a; PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2009). No banco de dados Rfam não há nenhuma sequência de sRNA próxima ou informação

correspondente referente às sequências dos sRNAs RNA01, RNA02, RNA04, Arrc14 e Arrc16, portanto, estes nunca foram reportados em estudos anteriores e desta forma foram selecionados para serem estudados neste trabalho. A verificação das linhagens Δ sRNAs foi feita por PCR (Figura 6) utilizando os *primers* listados na tabela 3 e a análise da expressão dos genes flanqueantes foi confirmada por RT-PCR (Figura 7) utilizando os *primers* listados na tabela 4, excluindo assim qualquer efeito polar das alterações introduzidas.

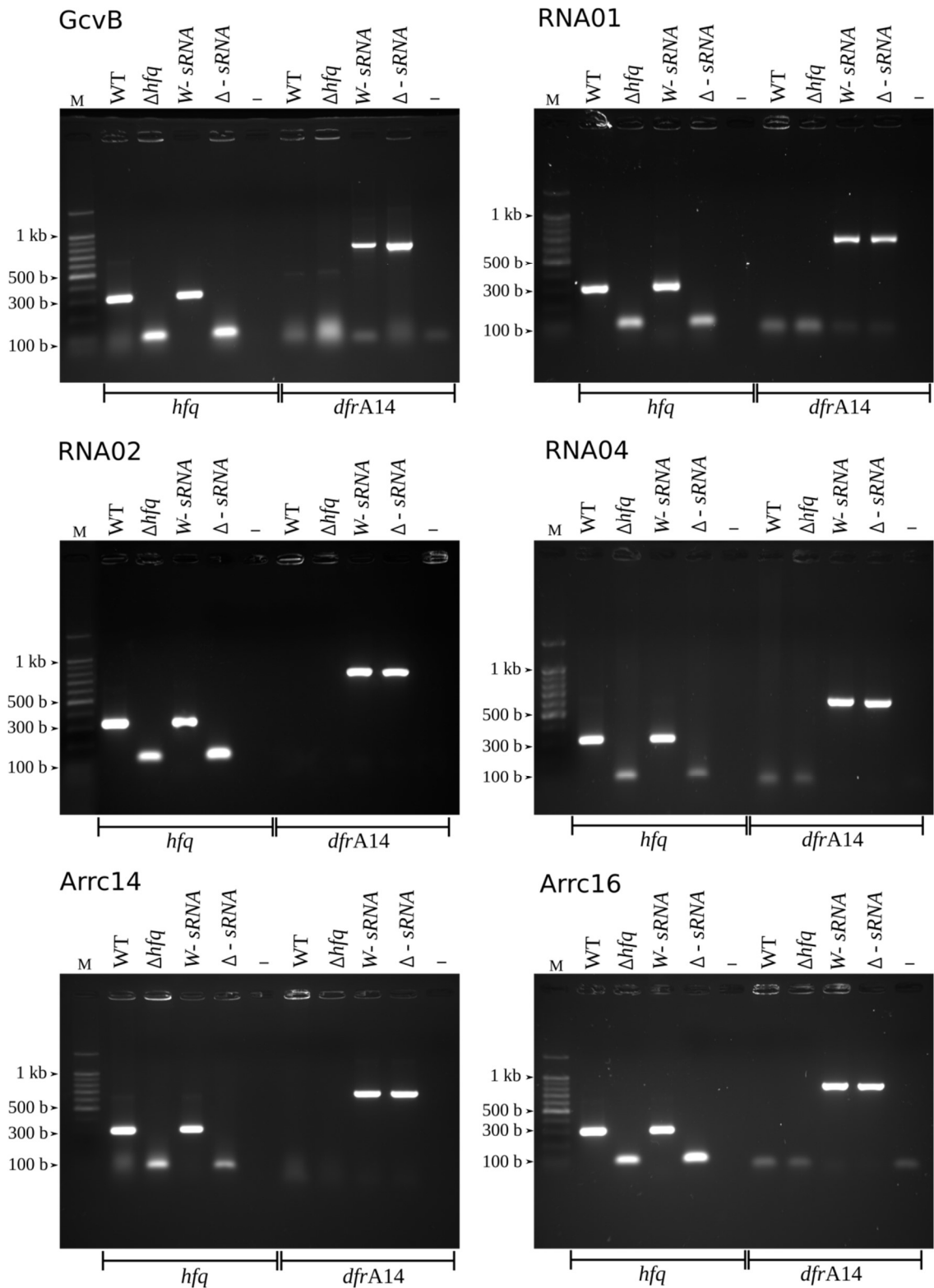


Figura 6. Verificação das linhagens de App Δ sRNAs. As linhagens foram verificadas por PCR para a deleção do gene *hfq* e/ou o sRNA específico. A linhagem parental Δhfq (CRISPIM, 2014) e as linhagens mutantes construídas a partir dela (canaletas Δ -sRNA) foram confirmadas com os *primers* *hfq_sacI* (5'GCGCGAGCTCATATTCCGCTTTATCCGCAACCGC3') e *ecoRI_hfq* (5'GCGCGAATTCAGGA AAAGAAAATGGCAAAAAGGTCAATCT3'), que amplificam toda a *ORF* (Open Reading Frame) do gene *hfq* e produz um amplicon de 290 pb para o gene WT e de 120 pb para o Δhfq , onde a maior parte da *ORF* foi removida. A confirmação das linhagens Δ sRNAs foi realizada com o primer *dfrA5_out* e com *primers* específicos para cada linhagem mutante (tabela 3), dependendo da organização gênica de cada sRNA. M: DNA ladder 100pb (Fermentas).

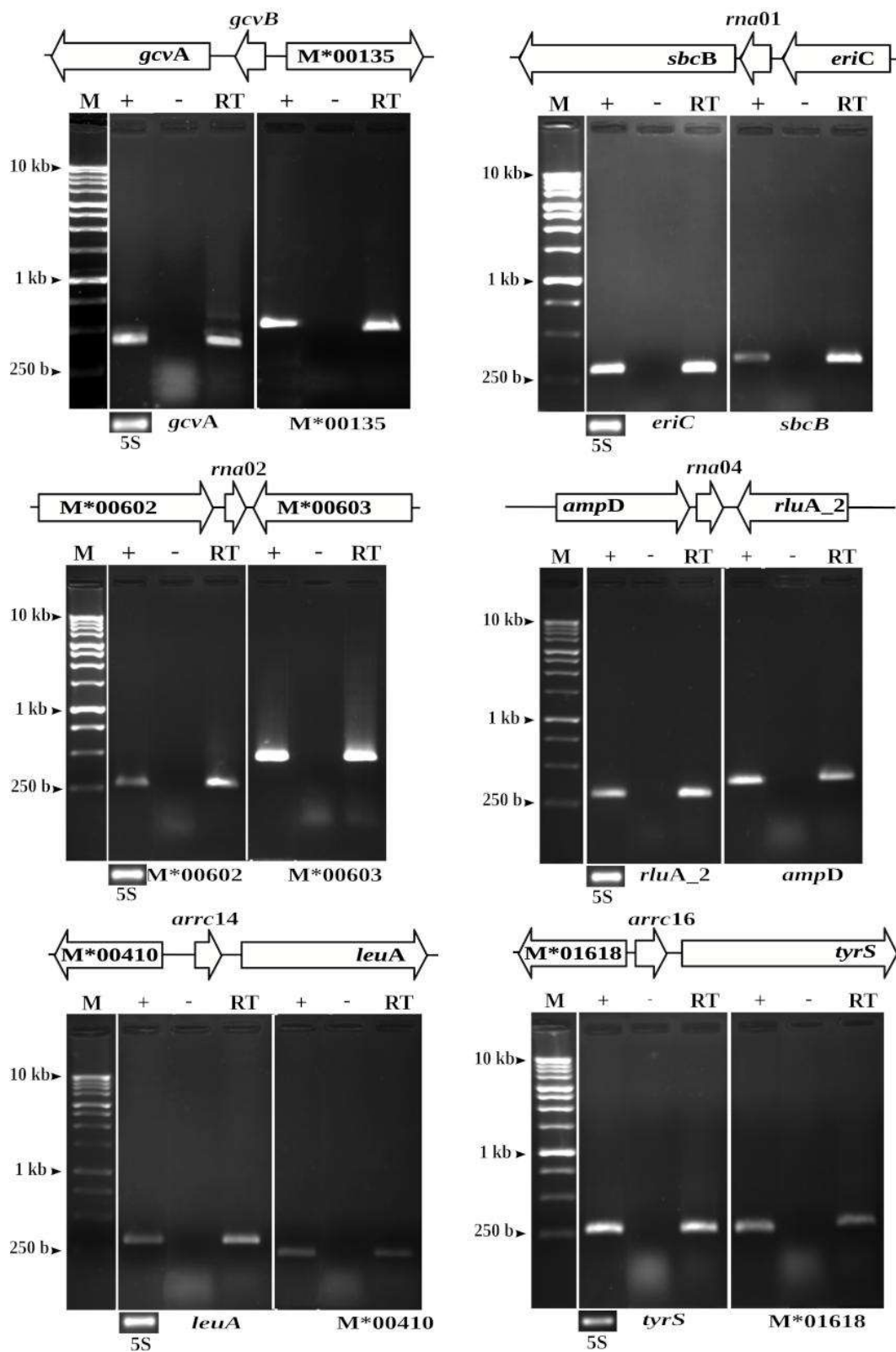


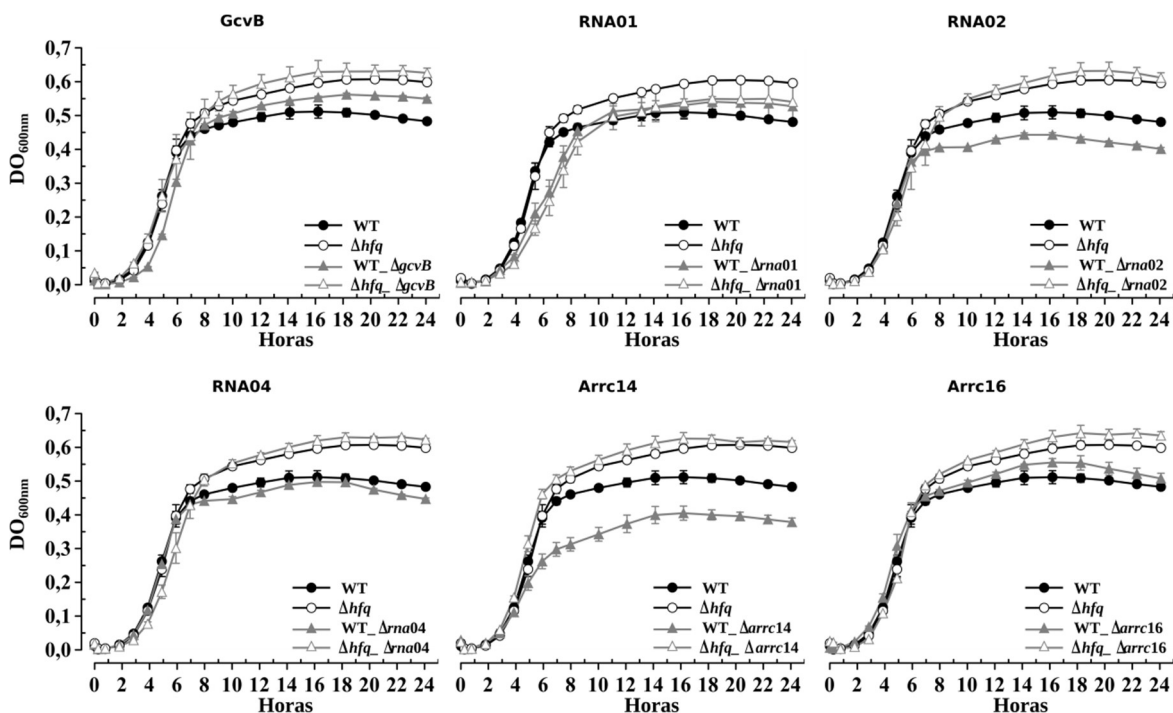
Figura 7. Confirmação da natureza não polar das mutações introduzidas nas linhagens de App Δ sRNA investigadas. A técnica de transcrição reversa associada à PCR (RT-PCR) foi utilizada nesta análise. A organização dos *loci* correspondentes a cada sRNA e os genes que os flanqueiam estão representados pelas setas acima de cada gel. RT indica a linhagem testada por RT-PCR, os símbolos + e - indicam os controles positivo (RNA total da linhagem parental WT tratado com DNase e submetido à RT-PCR) e negativo (RNA total tratado com DNase RT-). Os *primers* utilizados nesta análise estão listados na tabela 4. O controle endógeno de expressão foi rRNA 5S. M*: MIDG2331. M: DNA ladder 1kb (Promega).

Análises fenotípicas das linhagens de App Δ sRNAs

Análise do crescimento

O crescimento das linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e Δ sRNAs foi avaliado a partir da obtenção das curvas de crescimento obtidas pelo cultivo em microplacas. Ocorreram diminuições significativas ($p \leq 0,5$) na μ_{\max} das linhagens WT_ Δ rna01, WT_ Δ arrc14e Δ hfq_ Δ rna01 quando comparadas com seus respectivos parentais. A população total e crescimento máximo observado para as linhagens WT_ Δ rna02 e WT_ Δ arrc14 foi menor do que o do parental WT, enquanto que a linhagem WT_ Δ gcvb apresentou um crescimento máximo maior que o seu parental WT (Figura 8).

A



B

Atributo	Linhagem Parental	Linhagem mutante					
	WT	$\Delta gcvb$	$\Delta rna01$	$\Delta rna02$	$\Delta rna04$	$\Delta arrc14$	$\Delta arrc16$
Fase Lag	2,90	3,70	3,05	3,05	3,00	1,60	2,30
μ_{max}	0,127	0,128	0,086	0,134	0,136	0,057	0,115
Crescimento máximo	0,495	0,543	0,533	0,424	0,470	0,391	0,528
População total	9,51	9,88	9,47	8,23	9,07	7,24	10,18

Atributo	Linhagem Parental	Linhagem mutante					
	Δhfq	$\Delta gcvb$	$\Delta rna01$	$\Delta rna02$	$\Delta rna04$	$\Delta arrc14$	$\Delta arrc16$
Fase Lag	2,90	2,30	3,05	2,60	3,20	2,50	3,20
μ_{max}	0,120	0,095	0,079	0,097	0,108	0,127	0,129
Crescimento máximo	0,587	0,621	0,533	0,615	0,6124	0,605	0,619
População total	10,94	11,37	9,47	11,04	10,93	11,52	11,46

Figura 8. Crescimento das linhagens de App parentais e Δ sRNAs. **A** – Curvas de crescimento obtidas em microplacas como descrito em material e métodos. As barras representam o desvio padrão correspondente a três réplicas biológicas (com seis replicatas experimentais). **B** – Valores obtidos para a fase lag, velocidade de crescimento específica máxima (μ_{max}), crescimento máximo e população total a partir do modelo de regressão não linear de Weibull. A média dos valores de cada atributo das três replicatas biológicas independentes foi comparada por ANOVA. Números anotados com fundo cinza indicam diferença significativa ($p \leq 0,5$) da linhagem mutante em relação ao seu parental.

Ensaio de adesão em superfície abiótica e biótica

Para verificar se os sRNAs investigados estão envolvidos no mecanismo de adesão em superfícies abiótica e biótica foram realizados ensaios em placas de poliestireno e em monocamadas de células epiteliais de rim de suínos (PK15 – ATCC® CCL-33™), respectivamente. Foi observado que a adesão em superfície abiótica, após 24 horas de crescimento, é aumentada significativamente para as linhagens mutantes WT_Δ*rna02* e WT_Δ*arrc14*, sendo que essa última linhagem proporcionou um aumento de aproximadamente 250% na capacidade de adesão quando comparada com sua respectiva linhagem parental WT (Figura 9A). As demais linhagens apresentaram um padrão de aderência similar às respectivas linhagens parentais. Para as linhagens mutantes derivadas de Δ*hfq*, apenas a linhagem Δ*hfq*_Δ*arrc14* apresentou aumento significativo ($p \leq 0,05$) quando comparada com seu parental (Figura 9B).

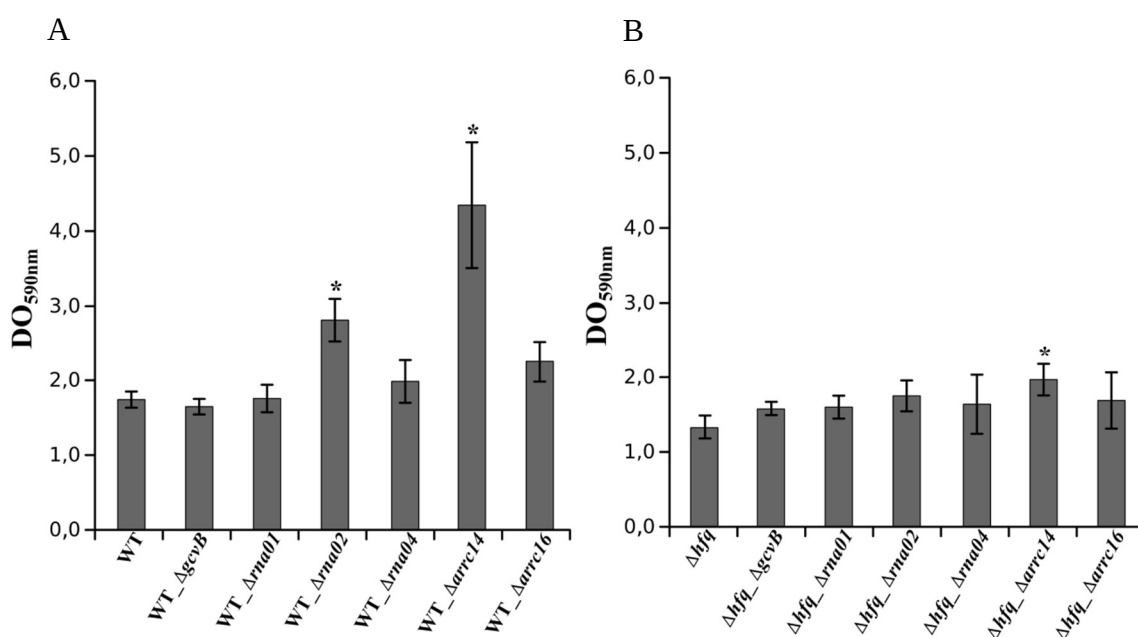


Figura 9. Aderência de linhagens de *A. pleuropneumoniae* derivadas dos parentais WT (A) ou Δ*hfq* (B) em placas de poliestireno após 24 horas de incubação em caldo BHI-NAD. Barras indicam o desvio padrão a partir de quatro repetições biológicas com quatro repetições técnicas. As médias das linhagens mutantes e seu respectivo parental foram comparadas por ANOVA. * - significativo para $p \leq 0,05$.

A análise da adesão das linhagens de *A. pleuropneumoniae* parentais e ΔsRNAs em monocamadas de células PK15 (Figura 10) evidenciou um comportamento de adesão semelhante àquele encontrado em superfície abiótica. Assim como observado nos ensaios anteriores. A linhagem WT_Δ*arrc14* destacou-se por apresentar adesão

superior àquela observada para a sua respectiva linhagem parental. WT_Δarrc16 apresentou o mesmo padrão de aderência que o seu parental WT e as linhagens WT_Δrna01, WT_Δrna02 e WT_Δrna04 apresentaram aproximadamente 80% de adesão quando comparadas com a adesão da linhagem parental WT. As linhagens mutantes Δhfq_ΔgcvB, Δhfq_Δrna01, Δhfq_Δrna02 e Δhfq_Δrna04 apresentaram diminuição significativa da adesão quando comparadas à linhagem parental Δhfq. As linhagens Δhfq_Δarrc14 e Δhfq_Δarrc16 apresentaram adesão superior à linhagem parental Δhfq, semelhante ao que foi observado para as análises de adsorção em superfície abiótica.

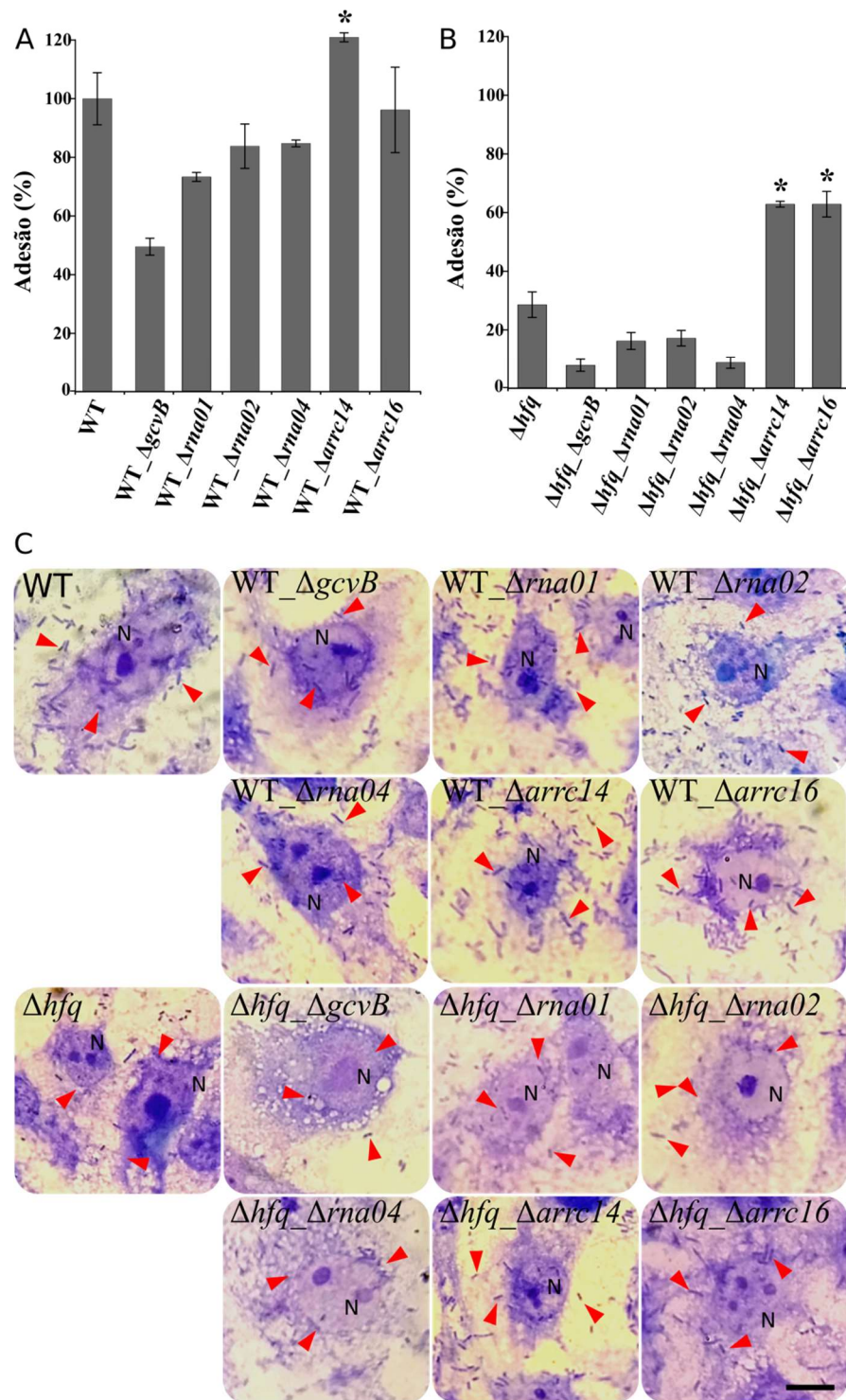


Figura 10. Ensaio de aderência das linhagens de App parentais e ΔsRNA em monocamadas de células PK15. Para investigar o perfil de aderência das diferentes linhagens em superfície biótica, linhagens parentais e mutantes foram adicionadas aos poços contendo monocamadas de PK15 (MOI de 100:1) e incubadas por duas horas. Bactérias não aderidas foram retiradas por lavagem e bactérias aderidas foram liberadas por tripsinização. A porcentagem de adesão em relação à linhagem parental (A) WT ou (B) Δhfq foi realizada por quantificação por microgota em ágar BHI-NAD. (C) A visualização da adesão foi realizada por microscopia óptica em um aumento original de 1000x após coloração por Giemsa. Barras em A indicam o desvio padrão a partir de três repetições biológicas com três repetições técnicas. As médias entre as linhagens mutantes e seus respectivos parentais foram comparadas por ANOVA.

* significativo para $p \leq 0,05$. N: Núcleo da célula PK15. Pontas de setas indicam bactérias aderidas na superfície celular. Barra em C: 10 μ m.

Neste trabalho, a adesão em superfície abiótica pelas linhagens investigadas apresentou aumento quando houve a deleção dos sRNAs RNA02 e Arrc14. Os demais não apresentaram alterações significativas. Interessantemente, quando avaliado a adesão em células PK15, ocorreu diminuição na adesão de cinco dos seis sRNAs testados, sendo que a deleção do sRNA Arrc14 promoveu aumento significativo na adesão.

Sensibilidade a agentes estressores e antibióticos

As linhagens parentais e Δ sRNAs foram avaliadas quanto à sensibilidade ao estresse causado pelo aumento da pressão osmótica, ambiente redutor, temperatura e quanto ao desenvolvimento em condições de aerobiose e anaerobiose. As linhagens parentais WT e Δ hfq mostraram-se sensíveis à variação osmótica ocasionada pelo aumento da concentração de KCl no meio de cultura, o que pode ser observado pela diminuição do crescimento destas linhagens quando submetidas a esta condição (Figura 11). A linhagem parental Δ hfq apresentou maior sensibilidade ao aumento da pressão osmótica e agente redutor quando comparada à linhagem MIDG2331 WT, como já demonstrado previamente (CRISPIM, 2014). Quando investigada a sensibilidade das linhagens Δ sRNAs em meio com ou sem adição de KCl, observou-se que as linhagens WT_ Δ arrc14 e Δ hfq_ Δ arrc14 não apresentaram aumento da sensibilidade ao estressor osmótico quando comparadas com as respectivas linhagens parentais. As demais linhagens apresentaram ao menos uma unidade logarítmica menor de crescimento quando comparados com controle (linhagens parentais). Para a análise sobre sensibilidade ao agente redutor peróxido de hidrogênio, todas as linhagens apresentaram redução no crescimento assim como as linhagens parentais MIDG2331 WT e Δ hfq, na concentração utilizada de peróxido de hidrogênio (Figura 11).

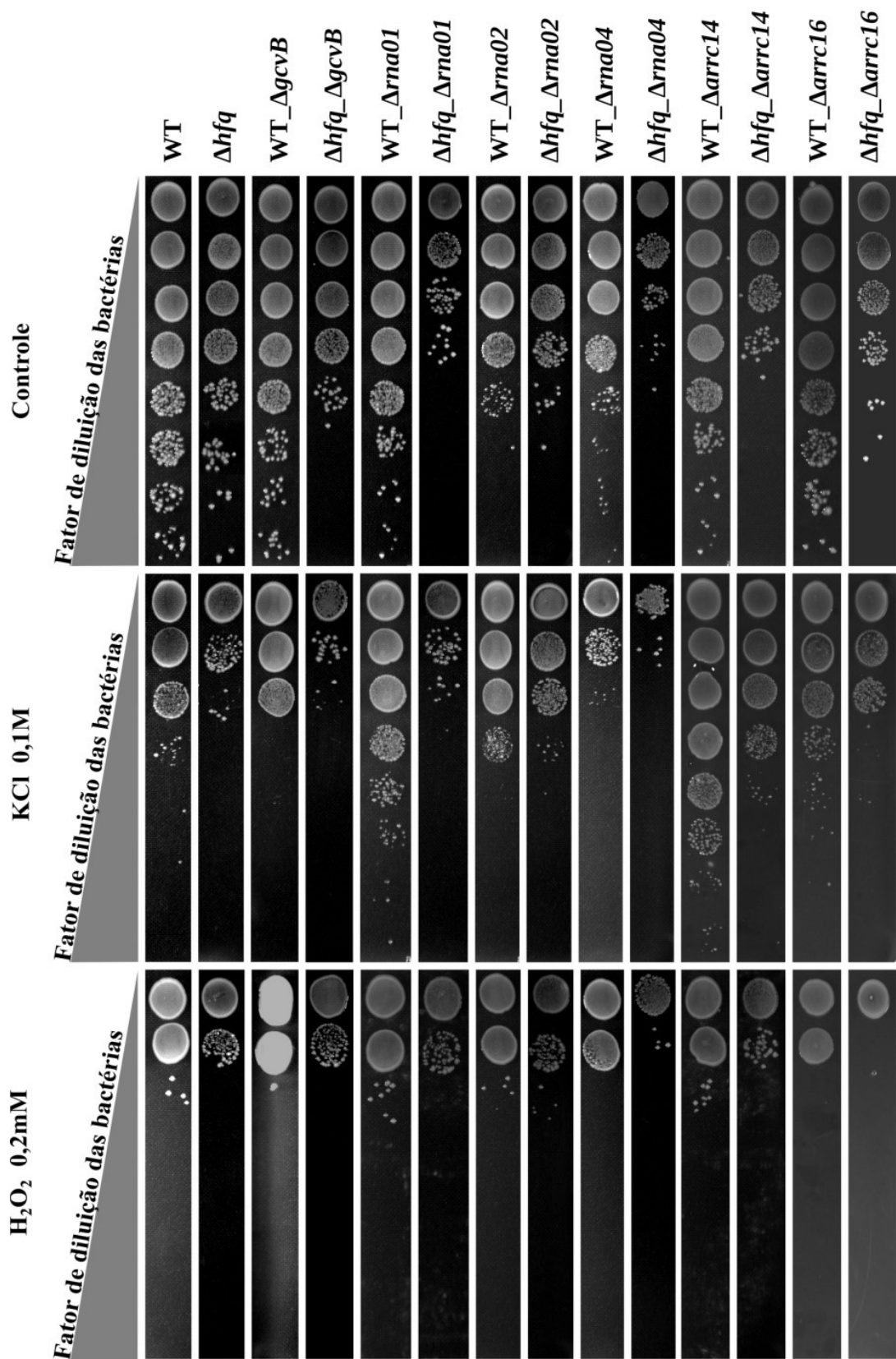


Figura 11. Perfil de sensibilidade das linhagens de App parentais e $\Delta sRNAs$ a estresses osmótico e oxidativo. Diluições seriadas das linhagens foram cultivadas em meio BHI-NAD suplementado com KCl 0,1M ou H₂O₂ 0,2 mM por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. O crescimento em ágar BHI-NAD sem adição de agentes estressores foi utilizado como controle positivo do ensaio.

Para as análises do crescimento na temperatura de 42 °C não houve crescimento para nenhuma das linhagens (parentais ou mutantes). Por outro lado, o crescimento em condições de aerobiose e anaerobiose foi o mesmo para todas as linhagens parentais e $\Delta sRNAs$ (dados não mostrados).

As linhagens parentais e $\Delta sRNAs$ foram avaliadas quanto à alteração na concentração inibitória mínima (CIM) frente aos antibióticos tilosina e ampicilina. As análises foram realizadas com base nos padrões estabelecidos pelo CLSI M31-A3 (CLSI, 2009) para teste por microdiluição em caldo. Todas as linhagens apresentaram o mesmo valor de CIM para ampicilina (4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Para o antibiótico tilosina, as linhagens mutantes WT_Δrna02, WT_Δrna04, WT_Δarrc14 e Δhfq_Δarrc14 apresentaram um valor de CIM de 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, enquanto as demais linhagens, inclusive as parentais WT e Δhfq, apresentaram CIM de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. De acordo com o ponto de corte estabelecido pela CLSI M31-A3, os valores de CIM obtidos colocam todas as linhagens resistentes à ampicilina e sensíveis a tilosina. Não foi observado diferença para as linhagens derivadas de WT em relação às derivadas de Δhfq. Apesar dos valores de CIM obtidos classificarem as linhagens sensíveis à tilosina, segundo (BOSSÉ et al., 2017) o *Clinical and Laboratory Standards Institute* retirou recentemente o ponto de corte para este antibiótico, não sendo, portanto, possível classificar as linhagens aqui analisadas como sensíveis ou resistentes para tilosina. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura S1 e Tabela S1 (material suplementar).

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica das linhagens de App parentais e $\Delta sRNAs$ foi avaliada a partir da capacidade de liberação da hemoglobina de eritrócitos de carneiro em contato com suspensão de bactérias (lise celular) (Figura 12). Com exceção da linhagem WT_Δarrc14,

todas as linhagens mutantes analisadas apresentaram atividade hemolítica significativamente inferior ($p \leq 0,05$) daquela observada para a linhagem App MIDG2331 WT. A deleção do gene *arrc14* aumentou a capacidade de hemólise em aproximadamente 13% quando comparada com a linhagem parental WT. Em relação à chaperona Hfq, a deleção do seu gene diminuiu a capacidade de hemólise quando comparado com a linhagem App MIDG2331 WT, independente da deleção do sRNA.

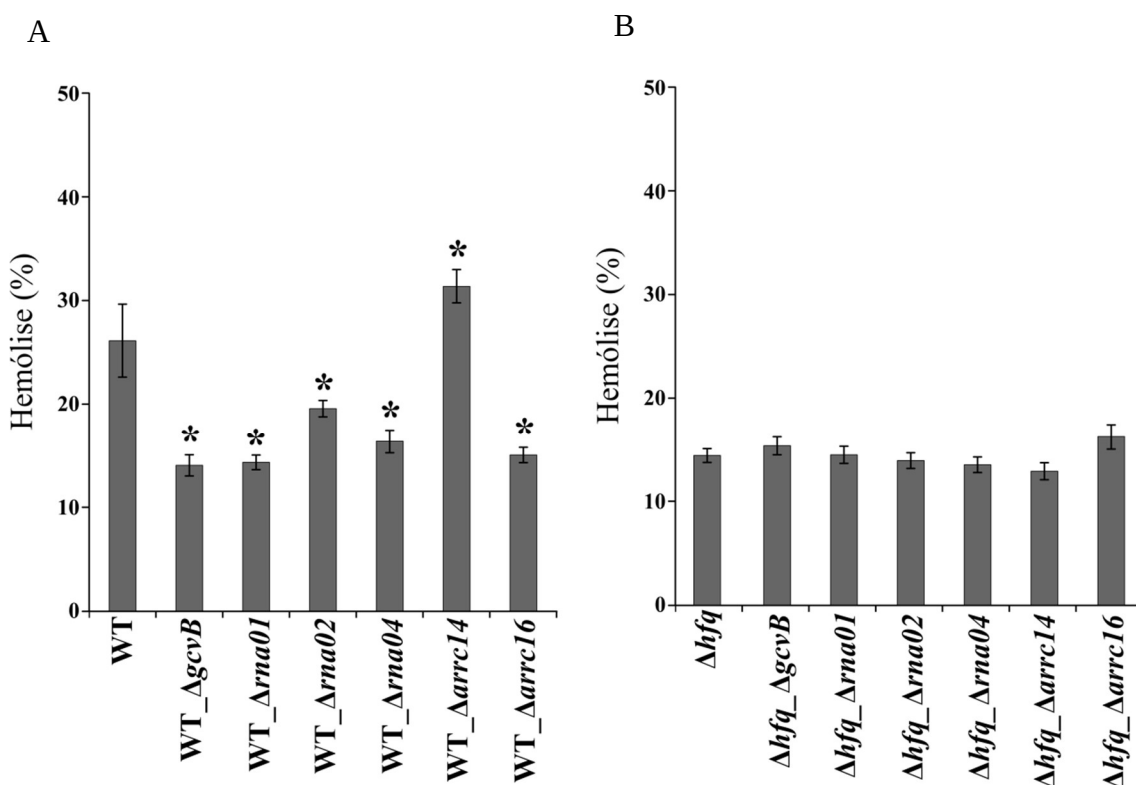
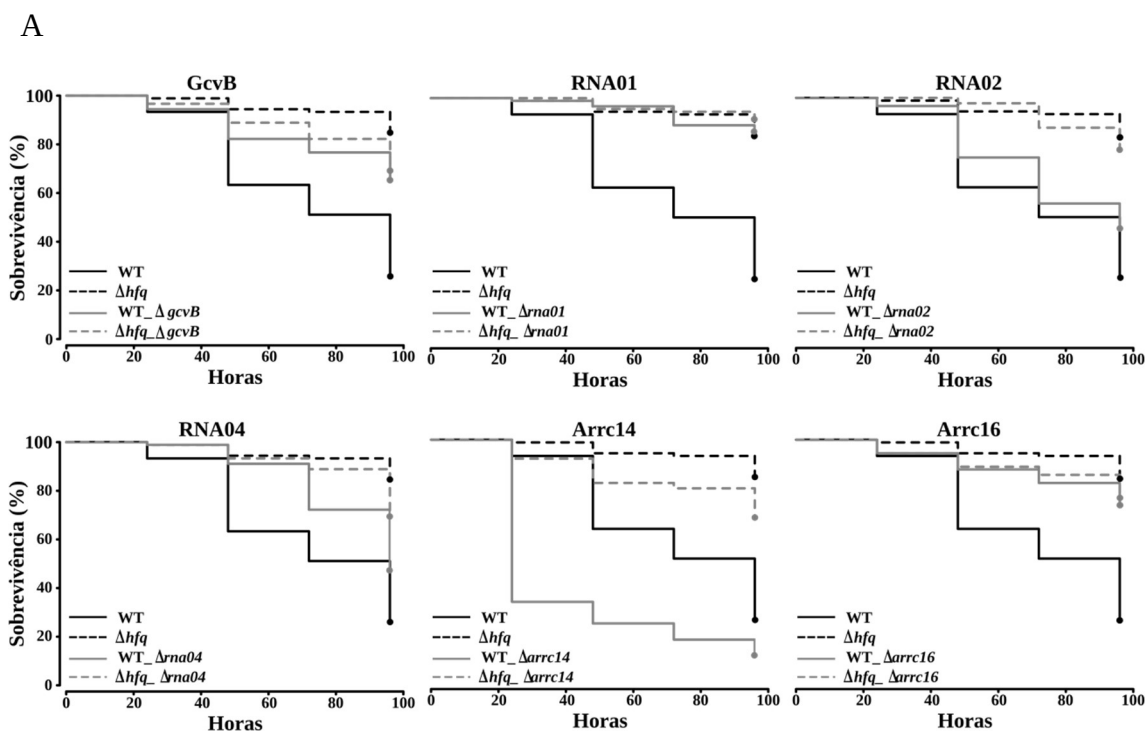


Figura 12. Atividade hemolítica das linhagens App Δ sRNAs derivadas dos parentais (A) WT e (B) Δ hfq em eritrócitos de carneiros. A liberação de hemoglobina de eritrócitos de carneiro foi avaliada como medida da atividade hemolítica. As médias a partir de três repetições biológicas com três replicatas experimentais foram comparadas por ANOVA utilizando software R com nível de significância de 5% de probabilidade. * significativo para $p \leq 0,05$.

Ensaio de virulência no modelo alternativo *Galleria mellonella*

A virulência das linhagens de App parentais e mutantes foi avaliada utilizando o modelo alternativo *G. mellonella* (Figura 13A). Larvas de *G. mellonella* apresentaram taxa de sobrevivência de 25,6% e 84,5% quando inoculadas com as linhagens parentais

WT e Δhfq , respectivamente. As linhagens mutantes WT_ $\Delta rna01$, WT_ $\Delta rna04$, WT_ $\Delta arrc16$ e WT_ $\Delta gcvB$ apresentaram atenuação significativa ($p \leq 0,01$) na virulência (Figura 13B) quando comparadas com a linhagem parental WT. Destas, WT_ $\Delta rna01$ foi a linhagem que apresentou maior atenuação, levando a uma sobrevivência das larvas na ordem de 84,4% após 96 horas de inoculação. A linhagem WT_ $\Delta arrc14$ foi mais virulenta que a linhagem WT, sendo observado uma sobrevivência de apenas 11,1% das larvas após 96 horas de infecção. A linhagem $\Delta hfq_ \Delta arrc14$ também apresentou aumento significativo da virulência quando comparada com seu parental Δhfq . As linhagens mutantes WT_ $\Delta rna02$ e $\Delta hfq_ \Delta rna02$ não apresentaram alterações significativas (Figura 13B) ($p \leq 0,01$) no padrão de virulência quando comparadas com seus respectivos parentais. Da mesma forma, as demais linhagens mutantes derivadas da parental Δhfq não apresentaram alterações significativas ($p \leq 0,01$) no padrão de virulência quando comparadas com seus respectivos parentais.



B

Linagem mutante	WT (<i>p-value</i>)	Linagem mutante	<i>p-value</i> Δhfq
Wt_ΔgcvB	5,118809 ⁻⁰⁷	Δhfq _ΔgcvB	0,011971
Wt_Δrna01	1,443290 ⁻¹⁵	Δhfq _Δrna01	0,112818
Wt_Δrna02	0,01329	Δhfq _Δrna02	0,437409
Wt_Δrna04	0,000291	Δhfq _Δrna04	0,016585
Wt_Δarrc14	2,352343 ⁻⁰⁸	Δhfq _Δarrc14	0,006376
Wt_Δarrc16	1,255515 ⁻¹⁰	Δhfq _Δarrc16	0,059977

Figura 13. Ensaio de virulência das linhagens de App parentais e Δ sRNAs em *Galleria mellonella*. **A** – A sobrevivência das lagartas foi avaliada através da estimativa de Kaplan-meier (KISHORE; GOEL; KHANNA, 2010) a partir de três repetições biológicas, contendo três repetições experimentais com dez lagartas em cada repetição. **B** – Valores de *p-value* entre as linhagens parentais e Δ sRNAs obtidos a partir da análise de log-rank sobre a curva de sobrevivência. Os valores abaixo do nível de significância de 0,01 (quadrantes cinzas) indicam que existe diferença significativa na sobrevivência do mutante em relação ao parental. A linhagem WT_Δarrc14 apresentou aumento da virulência em relação ao seu parental.

Colonização da linhagem WT_Δ*rna01* em *Galleria mellonella*

A capacidade da linhagem WT_Δ*rna01* colonizar o hospedeiro alternativo *G. mellonella* foi avaliada estimando-se a média de UFC obtida da hemolinfa das larvas testadas (Figura 14A). A confirmação da identidade das colônias resultantes foi feita por PCR utilizando o gene *apxIV* (Figura 14B). Não foi observado crescimento a partir da hemolinfa das larvas que não foram inoculadas com as linhagens parentais ou mutantes. O número de UFC/mL das linhagens WT e WT_Δ*rna01* apresentou aumento com quatro horas após a infecção, entrando em declínio após este período. Em 24 horas a UFC da linhagem WT apresentou duas unidades logarítmicas de declínio e a linhagem WT_Δ*rna01*, três unidades. Com até doze horas após a infecção ainda foi possível detectar o gene *apxIV* a partir das colônias isoladas da hemolinfa das lagartas infectadas com WT_Δ*rna01*, enquanto que para a linhagem parental WT a detecção foi possível com até 24 horas após a infecção. As linhagens parentais Δ*hfq* e Δ*hfq*_Δ*rna01* apresentaram queda contínua da medida de UFC após a infecção, sendo que o gene *apxIV* não foi mais detectado a partir de 8 horas de infecção em ambos os casos.

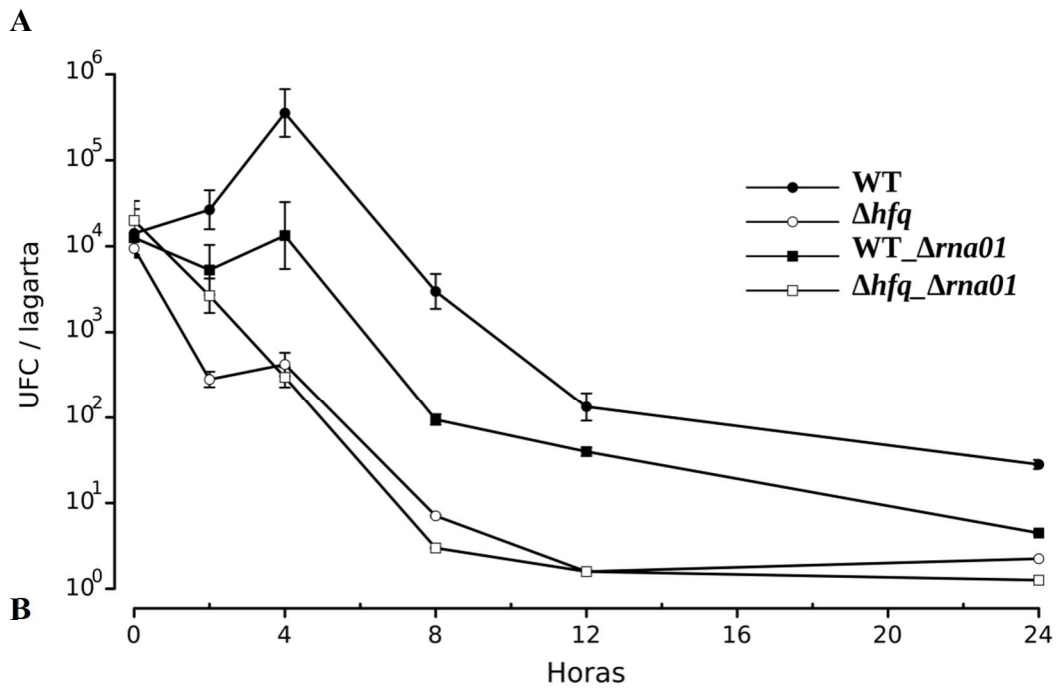


Figura 14. Colonização da linhagem WT $\Delta rna01$ em *Galleria mellonella*. Lagartas de *Galleria mellonella* foram inoculadas com 10^4 UFC e a hemolinfa foi coletada e plaqueada (A) em meio BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim com 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a infecção. (B) a presença das linhagens WT e WT $\Delta rna01$ também foi avaliada pela amplificação do gene *apxVI* a partir das colônias isoladas da hemolinfa da lagarta.

Análises *in silico*

Os sRNAs estão presentes na família Pasteurellaceae

Os resultados obtidos para a pesquisa de homólogos pelo *software* GLASSgo estão apresentados na Tabela 8. Com exceção do RNA04, os demais sRNAs apresentaram homólogos em outras espécies de bactérias da família Pasteurellaceae além de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. A família Pasteurellaceae compreende 73 espécies de bactérias *sensu strictu* contidas em 18 gêneros (CHRISTENSEN et al., 2014). O banco de dados NCBI possui depositado em seu acervo 269 genomas completos, compreendendo 65 espécies representativas dos 18 gêneros de Pasteurellaceae (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=712>). Foram encontrados homólogos dos sRNAs em 14 espécies, distribuídos em sete gêneros. Os sRNAs RNA01 e RNA02 apresentaram também homólogos nas famílias Bacillales e Mycoplasmatales (RNA01); e Vibrionaceae e Enterobacteriaceae (RNA02). Entretanto, após a análise de padrão de conservação de blocos de nucleotídeos eles foram considerados falsos positivos e eliminados das análises seguintes. RNA01 também apresentou um homólogo pertencente a um fago da família Siphoviridae, gênero Lambdavirus (*Mannheimia* phage vB_Mhs_535AP2) (Tabela 8 e Figura 15). Este homólogo apresentou padrão de conservação de blocos de nucleotídeos similar aos demais homólogos, sendo, portanto, mantido nas análises para determinação de sequência e estrutura consenso (Figura 17A).

Tabela 8. Distribuição dos homólogos detectados para os sRNAs no domínio Bacteria.

Família / Classe	Homólogos
RNA01	
Pasteurellaceae / Gammaproteobacteria	48
Bacillales / Firmicutes	1
Mycoplasmatales / Tenericutes	1
Siphoviriae / Virus dsDNA	1
RNA02	
Pasteurellaceae / Gammaproteobacteria	58
Vibrionaceae / Gammaproteobacteria	1
Enterobacteriaceae / Gammaproteobacteria	1
RNA04	
Pasteurellaceae / Gammaproteobacteria*	3
Arrc14	
Pasteurellaceae / Gammaproteobacteria	31
Arrc16	
Pasteurellaceae / Gammaproteobacteria	41
GcvB	
Pasteurellaceae / Gammaproteobacteria	43

*Todos os homólogos detectados pertencem à espécie *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

RNA02 foi o sRNA com maior distribuição (13 espécies), seguido de Arcc16 (9 espécies), GcvB (8 espécies) e Arcc14 (7 espécies). RNA01 apresentou homólogos em sete espécies de Pasteurellaceae e em um fago (Figura 15). Homólogos para RNA04 foram identificados apenas entre sorotipos da espécie *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

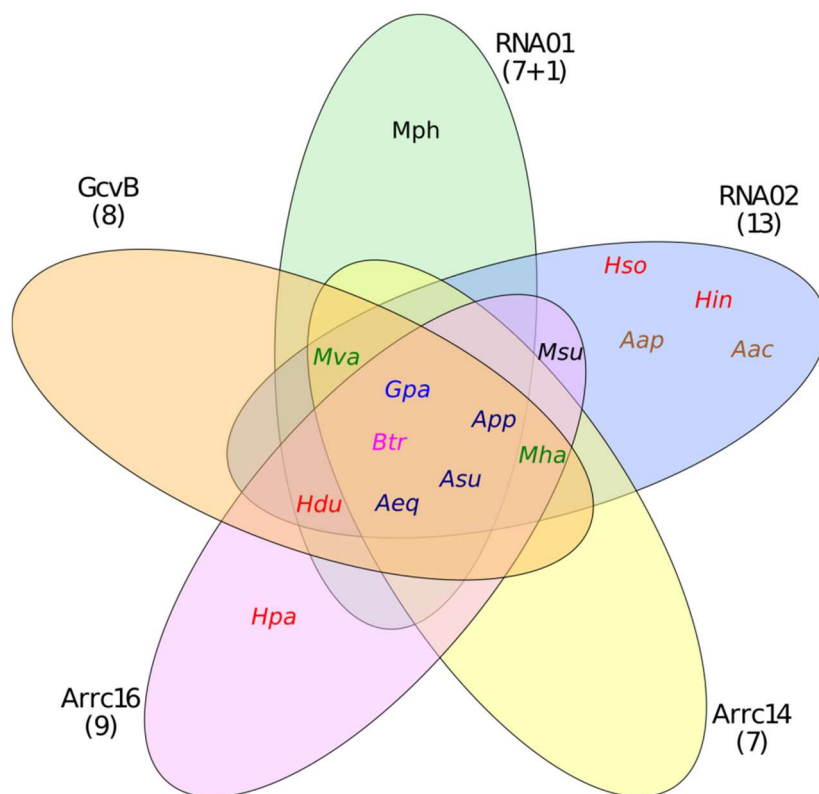


Figura 15. Os homólogos para sRNAs foram identificados em 14 espécies de bactérias da família Pasteurelanceae e em uma espécie de fago da família Siphoviridae. *Aeq* – *Actinobacillus equuli*; *App* – *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Asu* – *Actinobacillus suis*; *Aac* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Aap* – *Aggregatibacter aphrophilus*; *Btr* – *Bibersteinia trehalosi*; *Gpa* – *Glaesserella parasuis*; *Hdu* – *Haemophilus ducreyi*; *Hin* – *Haemophilus influenzae*; *Hpa* – *Haemophilus parainfluenzae*; *Hso* – *Haemophilus somnus*; *Mha* – *Mannheimia haemolytica*; *Msu* – *Mannheimia succiniciproducens*; *Mva* – *Mannheimia varigena*; *Mph* – *Mannheimia* fago vB Mhs 535AP2.

Os sRNAs homólogos possuem regiões altamente conservadas

A análise da conservação dos sRNAs mostrou que todos os sRNAs com homólogos possuem blocos de nucleotídeos conservados que apresentam regiões palindrômicas, envolvidas na formação de estruturas secundárias que são estruturais e sequencialmente similares tanto para o RNA de MIDG2331 quanto para a estrutura consenso, predita por RNAalifold. Os dados de cada espécie representativa dos homólogos identificados para os sRNAs estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Características dos homólogos identificados para sRNAs.

SRNA	Espécie homóloga	Tamanho (nucleotídeos)	Identidade* (%)
GcvB	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 7	173	98,85
	<i>Mannheimia varigena</i>	171	78,65
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	169	78,42
	<i>Actinobacillus equuli</i>	172	78,24
	<i>Actinobacillus suis</i>	172	77,32
	<i>Mannheimia haemolytica</i> strain	170	75,38
	<i>Glaesserella parasuis</i> strain SH03	172	74,62
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	166	68,84
RNA01	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 7	86	100,00
	<i>Actinobacillus suis</i>	87	94,38
	<i>Actinobacillus equuli</i>	87	92,22
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	85	74,23
	<i>Glaesserella parasuis</i>	85	71,00
	<i>Mannheimia varigena</i>	89	70,59
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	85	67,65
	<i>Mannheimia phage</i>	85	58,85
RNA02	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 7	81	100,00
	<i>Actinobacillus equuli</i>	80	92,77
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	79	82,76
	<i>Actinobacillus suis</i>	80	73,63
	<i>Glaesserella parasuis</i>	79	73,63
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	78	72,83
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	79	72,04
	<i>Haemophilus influenzae</i>	75	67,02
	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	77	63,54
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	77	63,54
	<i>Haemophilus somnus</i>	80	62,63
	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	76	60,20

Continuação

SRNA	Espécie homóloga	Tamanho (nucleotídeos)	Identidade* (%)
Arrc14	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 7	169	100,00
	<i>Actinobacillus equuli</i>	167	82,97
	<i>Actinobacillus suis</i>	169	82,51
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	158	68,56
	<i>Mannheimia varigena</i>	171	68,32
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	170	68,16
	<i>Glaesserella parasuis</i>	162	67,51
Arrc16	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> sorotipo 7	149	89,24
	<i>Actinobacillus suis</i>	149	88,05
	<i>Actinobacillus equuli</i> subsp, <i>Equuli</i>	148	86,25
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	150	78,44
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	150	76,33
	<i>Glaesserella parasuis</i>	150	73,84
	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	150	70,86
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	146	66,67
	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	150	59,26

* Identidade em relação ao sRNA de MIDG2331

O sRNA GcvB de MIDG2331 possui 173 nucleotídeos. Os homólogos obtidos para ele apresentaram entre 166 (*Bibersteinia trehalosi*) e 172 (*Actinobacillus suis* e *equuli*) nucleotídeos. Foram observadas grandes áreas conservadas nas regiões 3' e intermediária da sequência do sRNA, ao contrário da região 5', que apresentou importante variabilidade (Figuras 16A e B). A manutenção das regiões conservadas entre os homólogos foi maior entre as espécies do gênero *Actinobacillus* e a espécie *Haemophilus ducreyi*, enquanto que bactérias do gênero *Mannheimia* e as espécies *Glaesserella parasuis* e *Bibersteinia trehalosi* se posicionaram mais distante. Este agrupamento coincidiu com o agrupamento obtido para a análise filogenética obtida para o 16S rDNA (Figura 16D). A estrutura secundária consenso de GcvB (Figuras 16C) apresentou regiões conservadas e com alta probabilidade de pareamento que se alinham com a estrutura secundária de GcvB predita a partir da sequência de MIDG2331 (Figura 16E).

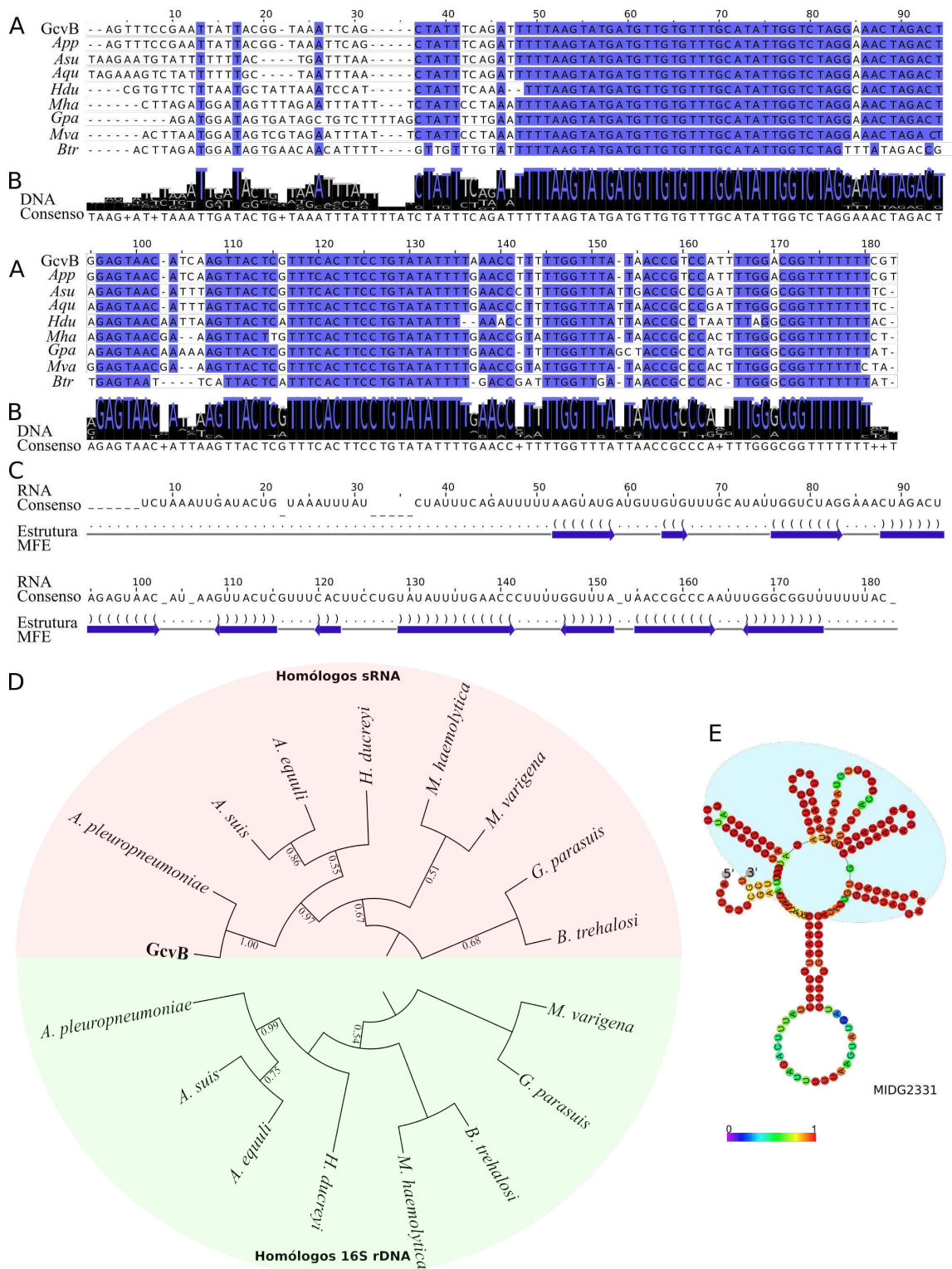


Figura 16. **A** - Predição de homólogos para GcvB obtida por GLASSgo utilizando parâmetros de baixa estringência após alinhamento por MAFFT e exclusão dos falsos positivos. O alinhamento foi visualizado em JALVIEW e os blocos com identidade de nucleotídeos $\geq 80\%$ estão representados em azul. **B** - Sequências consenso obtidas por JALVIEW após alinhamento por MAFFT. **C** - Predição da estrutura MFE obtida a partir da sequência consenso entre os homólogos através de RNAalifold. **D** - Distribuição filogenética dos sRNAs dentro da família Pasteurellaceae, analisadas pelo método de máxima verossimilhança e comparada com a distribuição filogenética para as sequências 16S do rDNA. **E** - Estrutura secundária de GcvB para MIDG2331 obtida por RNAfold. A área sombreada em azul indicam estruturas conservadas que foram deduzidas a partir da sequência consenso obtido em C. A barra de cor indica a probabilidade do pareamento.

RNA01 é um sRNA apresenta um tamanho de 86 nucleotídeos, sendo os homólogos identificados em *Glaesserella parasuis* e *Mannheimia varigena* com 84 e 89 nucleotídeos, respectivamente. O alinhamento dos homólogos apresentou blocos de nucleotídeos bastante conservados na porção central da sua sequência de nucleotídeos, sendo as regiões 3' e 5' bastante variáveis (Figuras 17A e B). Na região terminal 3', apenas a região terminadora da transcrição mostrou-se conservada entre os homólogos. RNA01 apresentou identidade maior com os gêneros *Actinobacillus* e *Haemophilus* e ficou mais distante dos gêneros *Mannheimia* e *Bibersteinia* (Figura 17D). A distribuição filogenética de RNA01 foi similar à distribuição filogenética obtida para o gene 16S rDNA dos homólogos (Figura 17D).

A estrutura secundária predita para a sequência consenso apresentou padrão similar à estrutura secundária predita para RNA01. Foram preditas 3 alças na estrutura secundária de RNA01, sendo duas idênticas com a estrutura consenso predita (Figura 17C). Uma terceira alça predita para RNA01 não foi observada na estrutura consenso. Esta alça está localizada na porção 5' do sRNA, que apresentou grande variabilidade quando comparada com os demais homólogos (Figuras 17A e B).

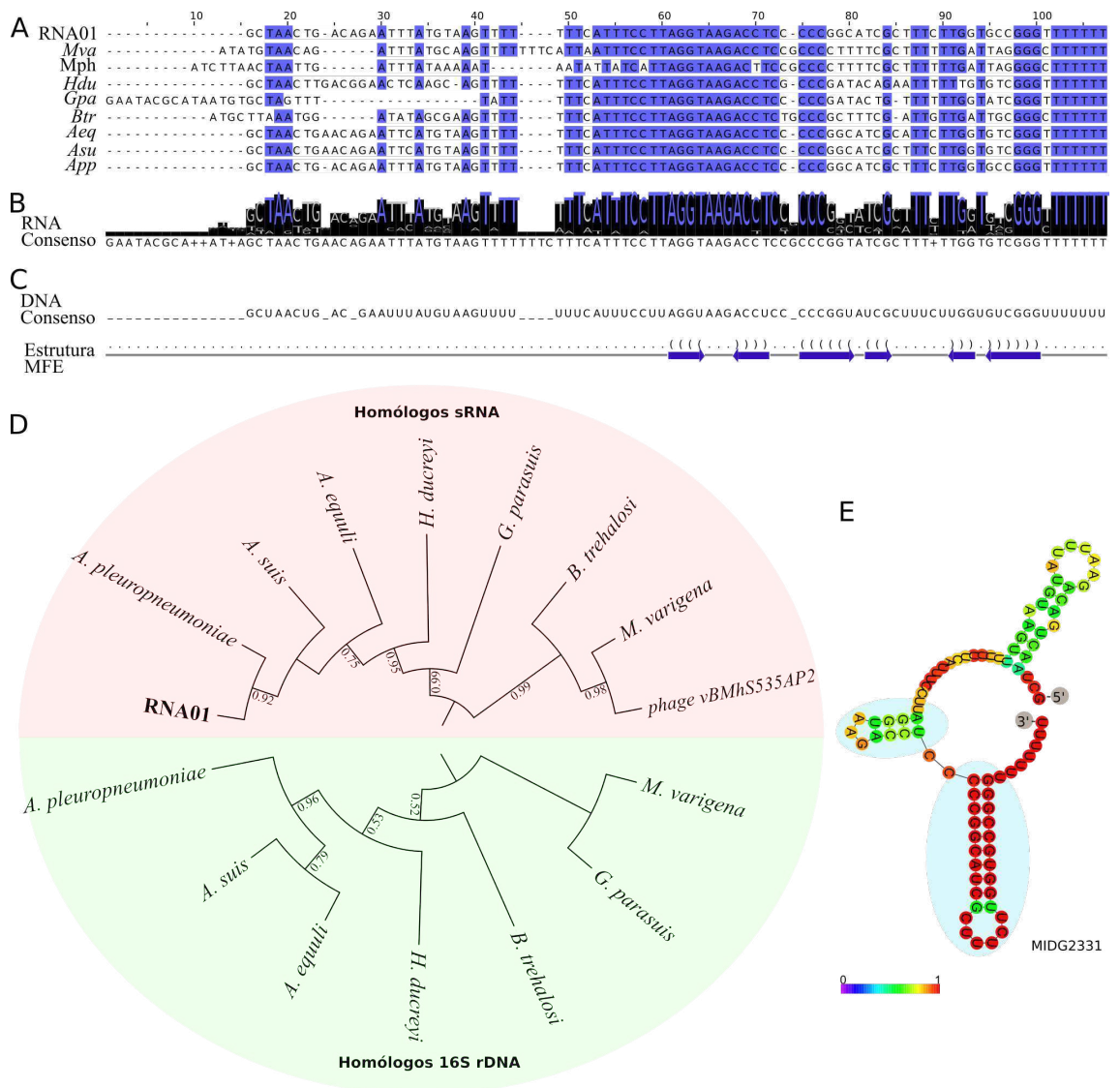


Figura 17. A - Predição de homólogos para RNA01 obtida por GLASSgo utilizando parâmetros de baixa estrigência após alinhamento por MAFFT e exclusão dos falsos positivos. O alinhamento foi visualizado em JALVIEW e os blocos com identidade de nucleotídeos $\geq 80\%$ estão representados em azul. **B** - Sequências consenso obtidas por JALVIEW após alinhamento por MAFFT. **C** - Predição da estrutura MFE obtida a partir da sequência consenso entre os homólogos através de RNAalifold. **D** - Distribuição filogenética dos sRNAs dentro da família Pasteurellaceae, analisadas pelo método de máxima verossimilhança e comparada com a distribuição filogenética para as sequências 16S do rDNA. **E** - Estrutura secundária de RNA01 para MIDG2331 obtida por RNAfold. As áreas sombreadas em azul indicam estruturas conservadas que foram deduzidas a partir da sequência consenso obtido em C. A barra de cor indica a probabilidade do pareamento.

Entre os sRNAs estudados neste trabalho, RNA02 apresentou o menor tamanho (81 nucleotídeos – Tabela 7), sendo que seus homólogos tiveram tamanhos que variaram entre 75 nucleotídeos para *Haemophilus influenzae* e 81 para o sorotipo 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Tabela 9). RNA02 também foi o sRNA com maior número de homólogos preditos na família Pasteurellaceae (Figura 18A). Apesar de apresentar o mesmo padrão de distribuição filogenética para os genes RNA02 e 16S rDNA dentro do gênero *Actinobacillus*, a distribuição filogenética apresentou divergência entre estes genes quando comparado com as bactérias filogeneticamente mais distantes (Figura 18D). Quanto à conservação de sua sequência entre os homólogos, RNA02 apresentou um bloco central de nucleotídeos bastante conservado e pequenos blocos distribuídos nas extremidades 5' e 3' com conservação acima de 80% (Figura 18A e B). A variabilidade dos nucleotídeos nas regiões com baixa conservação contribuiu para a predição de uma estrutura secundária derivada a partir da sequência consenso (Figura 18C) distinta da estrutura secundária predita para RNA02. Apesar desta diferença entre as estruturas, elas apresentaram três alças conservadas similares entre as estruturas preditas para a sequência consenso e RNA02 (Figura 18E). Uma quarta alça foi predita para RNA02 que não apresentou correspondência na estrutura predita para a sequência consenso. Esta alça está posicionada na extremidade 5', em região de alta variabilidade entre os homólogos (Figuras 18A e C).

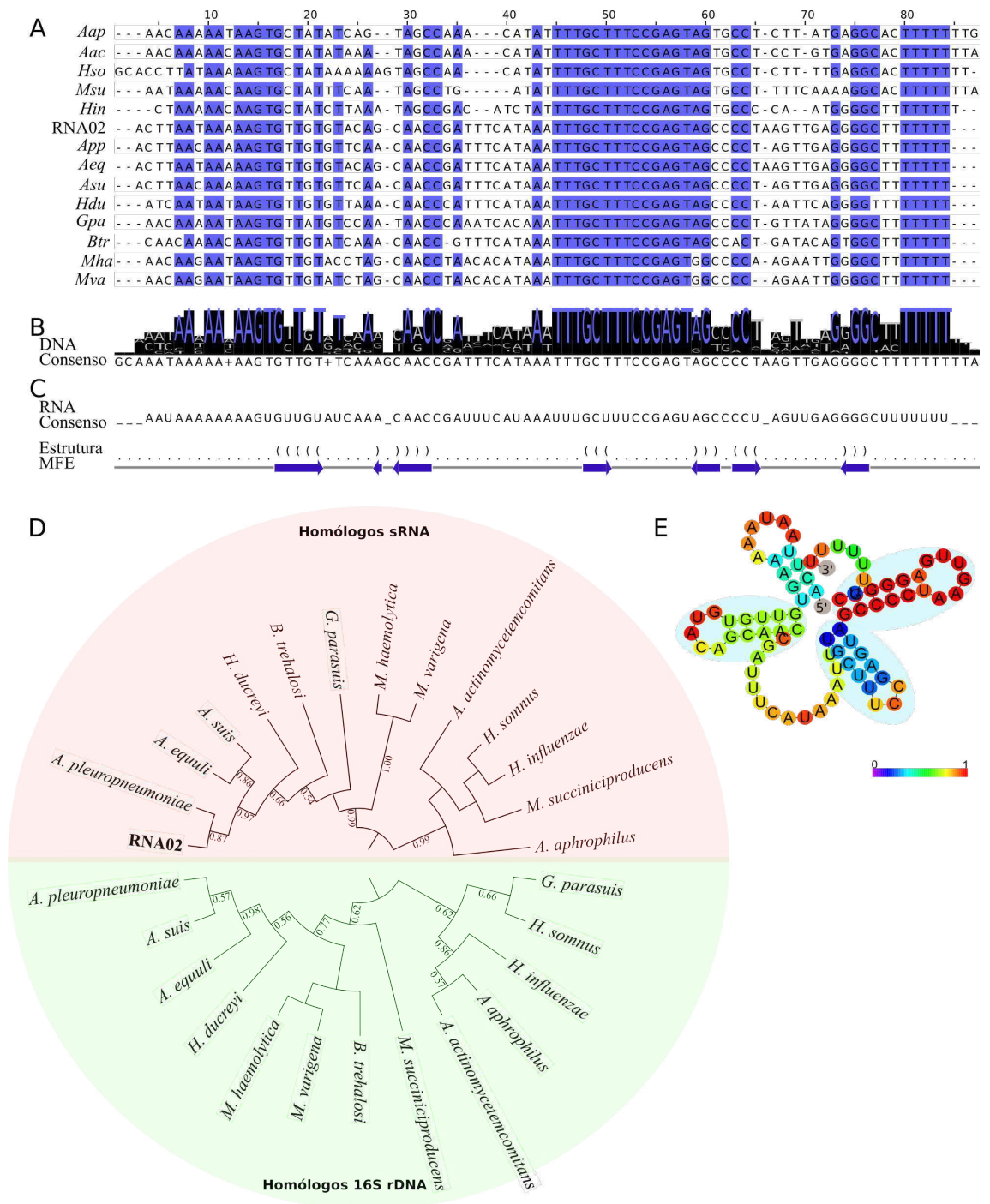


Figura 18. A - Predição de homólogos para RNA02 obtida por GLASSgo utilizando parâmetros de baixa estringência após alinhamento por MAFFT e exclusão dos falsos positivos. O alinhamento foi visualizado em JALVIEW e os blocos com identidade de nucleotídeos $\geq 80\%$ estão representados em azul. B - Sequências consenso obtidas por JALVIEW após alinhamento por MAFFT. C - Predição da estrutura MFE obtida a partir da sequência consenso entre os homólogos através de RNAalifold. D - Distribuição filogenética dos sRNAs dentro da família Pasteurellaceae, analisadas pelo método de máxima verossimilhança e comparada com a distribuição filogenética para as sequências 16S do rDNA. E - Estrutura secundária de RNA02 para MIDG2331 obtida por RNAfold. As áreas sombreadas em azul indicam estruturas conservadas que foram deduzidas a partir da sequência consenso obtido em C. A barra de cor indica a probabilidade do pareamento.

Arrc14 é um sRNA composto de 169 nucleotídeos que apresentou conservação em sua sequência bastante abrangente (Figuras 19A e B), sendo observados blocos de nucleotídeos conservados por toda a extensão do sRNA. Os homólogos identificados para Arrc14 variaram seu tamanho entre 158 (*Bibersteinia trealosi*) e 171 (*Mannheimia varigena*) nucleotídeos (Tabela 9). As estruturas secundárias previstas para Arrc14 e para a sequência consenso apresentou grande similaridade estrutural em duas regiões do sRNA: uma alça próxima do terminal 3', e uma alça intermediária que abrange aproximadamente 50% da extensão do sRNA (Figuras 19C e E). Arrc14 foi o sRNA aqui estudado que apresentou menor distribuição dentro da família Pasteurellaceae, sendo encontrados sete espécies que apresentam homólogos para Arrc14. Quanto à distribuição filogenética do gene, Arrc14 acompanhou a distribuição do gene 16S rDNA (Figura 19D).

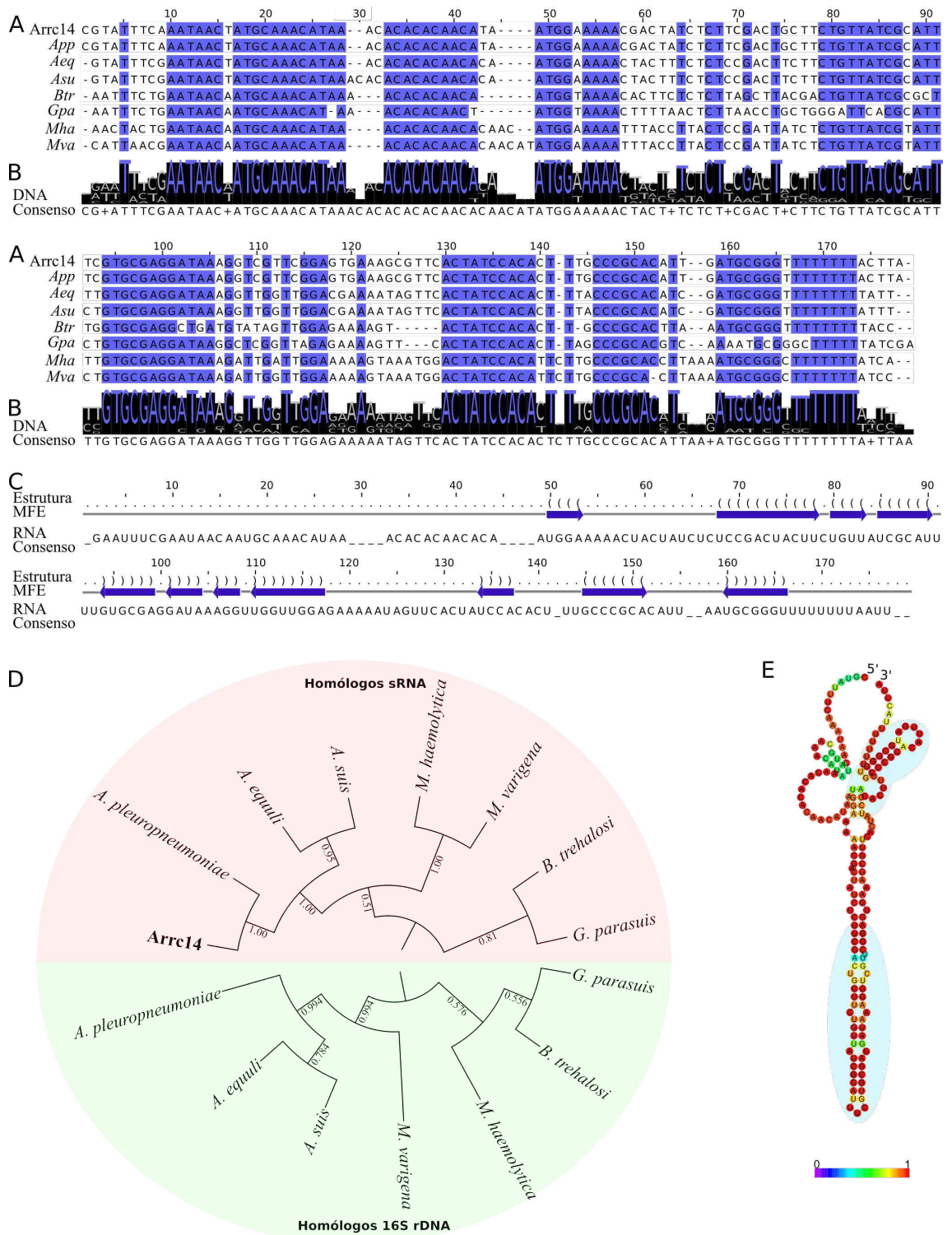


Figura 19. A - Predição de homólogos para Arrc14 obtida por GLASSgo utilizando parâmetros de baixa estrigência após alinhamento por MAFFT e exclusão dos falsos positivos. O alinhamento foi visualizado em JALVIEW e os blocos com identidade de nucleotídeos $\geq 80\%$ estão representados em azul. **B** - Sequências consenso obtidas por JALVIEW após alinhamento por MAFFT. **C** - Predição da estrutura MFE obtida a partir da sequência consenso entre os homólogos através de RNAalifold. **D** - Distribuição filogenética dos sRNAs dentro da família Pasteurellales, analisadas pelo método de máxima verossimilhança e comparada com a distribuição filogenética para as sequências 16S do rDNA. **E** - Estrutura secundária de Arrc14 para MIDG2331 obtida por RNAfold. As áreas sombreadas em azul indicam estruturas conservadas que foram deduzidas a partir da sequência consenso obtido em C. A barra de cor indica a probabilidade do pareamento.

O sRNA Arrc16 possui 151 nucleotídeos, com seus homólogos variando o número de nucleotídeos entre 146 (*Haemophilus parainfluenzae*) e 150 (*Haemophilus ducreyi*, *Mannheimia haemolytica*, *Bibersteinia trehalosi*, *Glaesserella parasuis* e *Mannheimia succinici producens*). Arrc16 apresentou entre a região mediana e o terminal 3' conservação bastante acentuada (Figuras 20A e B), mesmo para espécies com homólogos que apresentaram baixa identidade de interação, como *Haemophilus parainfluenzae* e *Mannheimia succiniciproducens* (Tabela 9). Apesar de conservada, a estrutura deduzida para a sequência consenso dos homólogos (Figura 20C) apresentou-se diferente da estrutura predita para Arrc16 (Figura 20E). Apenas a alça relativa à região de terminação da molécula de Arrc16 foi obtida para a estrutura da sequência consenso. Por outro lado, a estrutura da sequência consenso originou uma alça que não foi predita para Arrc16. Foram encontrados homólogos para Arrc16 em nove espécies de Pasteurellaceas, sendo que a distribuição filogenética do gene para Arrc16 apresentou similaridade com a distribuição filogenética de 16S rDNA para o gênero *Actinobacillus* e as espécies *Haemophilus ducreyi*, *Mannheimia succiniciproducens* e *Mannheimia haemolytica*. Para as demais espécies, a distribuição filogenética do gene de Arrc16 apresentou-se distinta da distribuição filogenética de 16S rDNA (Figura 20D).

Ao contrário dos demais sRNAs, RNA04 não apresentou homólogos em outras espécies de bactérias, além de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, na pesquisa realizada. Sua estrutura secundária, predita por RNAfold, está representada na Figura 21.

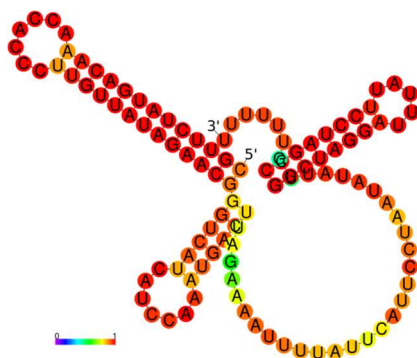


Figura 21. Estrutura secundária do sRNA RNA04 predita por RNAfold. A barra de cor indica a probabilidade do pareamento.

Os sRNAs e seus potenciais alvos mRNAs

Para avaliar os potenciais alvos de regulação dos sRNAs foram realizadas análises utilizando a ferramenta CopraRNA. Esta ferramenta utiliza a pesquisa com base na presença de interação em no mínimo três homólogos do RNA de interesse, encontrados em espécies diferentes e que apresentem distâncias filogenéticas distintas. Conforme descrito anteriormente, os homólogos para os sRNAs foram identificados a partir do uso da ferramenta GlassGO. Após as predições a ferramenta CopraRNA agrupa os genes homólogos a partir de suas sequências de aminoácido e então utiliza estes grupos para calcular o *p-value* de cada agrupamento. As predições que apresentaram $p\text{-value} \leq 0,01$ foram consideradas significativas para fins de análise. A função de cada mRNA alvo predito foi descrita conforme o RefSeq do genoma para MIDG2331, de acordo com a anotação funcional constante. Os resultados da predição de cada sRNA estão apresentados nas tabelas 10 a 14. A predição dos potenciais alvos do sRNA RNA04 foi realizada pela ferramenta IntaRNA, que atua de forma similar ao CopraRNA, mas sem realizar a pesquisa comparativa com espécies homólogas. Os dados para RNA04 estão apontados na tabela 15.

Tabela 10. Alvos preditos para GcvB no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.

p-value	Locus tag	Gene	Posição mRNA		Posição sRNA		Anotação
			Início	Fim	Início	Fim	
0,00000	midg2331_rs00380	<i>ilvE</i>	60	66	58	64	branched-chain amino acid aminotransferase
0,00000	midg2331_rs00670	N/A	74	87	155	168	ribosome small subunit-dependent GTPase
0,00002	midg2331_rs10205	<i>pqiA</i>	-198	-169	105	146	paraquat-inducible protein A
0,00005	midg2331_rs10835	<i>corA</i>	-55	-18	22	58	magnesium transporter CorA
0,00006	midg2331_rs10585	<i>lppB_1</i>	-85	-42	111	158	outer membrane antigenic lipoprotein B
0,00018	midg2331_rs06800	<i>ptsI</i>	4	40	112	161	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase PtsI
0,00044	midg2331_rs01210	N/A	-191	-181	144	154	hypothetical protein
0,00047	midg2331_rs06065	<i>nahR</i>	-136	-109	110	138	transcriptional regulator
0,00048	midg2331_rs09105	<i>rbsR</i>	-96	-57	110	146	LacI family transcriptional regulator
0,00068	midg2331_rs09900	<i>xerC_2</i>	-51	-30	103	122	tyrosine recombinase XerC
0,00070	midg2331_rs01595	N/A	-108	-96	135	148	ABC transporter ATP-binding protein
0,00071	midg2331_rs06255	<i>malK</i>	-97	-57	120	151	ABC transporter ATP-binding protein
0,00082	midg2331_rs10645	<i>nudF</i>	-159	-145	50	64	ADP-ribose diphosphatase
0,00092	midg2331_rs05240	N/A	51	92	102	162	hypothetical protein
0,00098	midg2331_rs02125	<i>ecfE</i>	32	45	102	115	RIP metalloprotease RseP
0,00103	midg2331_rs02230	N/A	-130	-112	107	123	YceK/YidQ family lipoprotein
0,00113	midg2331_rs08010	<i>menA</i>	-23	4	136	163	1,4-dihydroxy-2-naphthoate polyprenyltransferase
0,00120	midg2331_rs00550	<i>putA</i>	36	43	22	29	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase /proline dehydrogenase
0,00133	midg2331_rs04075	<i>lysS</i>	-152	-135	110	125	lysine-tRNA ligase
0,00169	midg2331_rs02775	<i>mukF</i>	-52	-39	53	65	chromosome partition protein MukF
0,00178	midg2331_rs04185	N/A	24	65	106	169	murein hydrolase activator EnvC
0,00198	midg2331_rs06200	N/A	59	84	134	158	uncharacterized protein involved inoxidation of intracellular sulfur
0,00204	midg2331_rs06730	<i>nagBI</i>	79	86	22	29	6-phosphogluconolactonase
0,00232	midg2331_rs06375	<i>pstS</i>	-175	-157	145	163	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS
0,00242	midg2331_rs02895	N/A	-70	-44	22	60	peroxide stress protein YaaA
0,00253	midg2331_rs05490	<i>arcD2</i>	66	79	144	157	arginine:ornithine antiporter
0,00256	midg2331_rs01645	<i>rlmJ</i>	-163	-134	115	144	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J
0,00272	midg2331_rs06745	N/A	-43	-30	146	159	ADP compounds hydrolase NudE
0,00289	midg2331_rs11085	<i>yhhQ</i>	49	59	57	67	Inner membrane protein YhhQ
0,00295	midg2331_rs10265	N/A	-118	-64	110	165	hypothetical protein
0,00330	midg2331_rs10955	<i>rsmC</i>	-169	-154	145	160	16S rRNA methyltransferase
0,00332	midg2331_rs09670	<i>rplD</i>	-44	-4	94	161	50S ribosomal protein L4
0,00344	midg2331_rs08185	N/A	-81	-42	120	158	peptidoglycan-binding protein LysM
0,00351	midg2331_rs02135	<i>uppS</i>	-140	-99	23	65	isoprenyl transferase
0,00361	midg2331_rs02725	<i>pyrH</i>	82	95	14	27	UMP kinase
0,00367	midg2331_rs00780	<i>nqrC</i>	-178	-137	114	156	NADH:ubiquinone reductase
0,00381	midg2331_rs05445	<i>thiI</i>	-131	-94	22	62	tRNA 4-thiouridine
0,00389	midg2331_rs00125	<i>recN</i>	-96	-82	145	158	DNA repair protein RecN
0,00411	midg2331_rs09740	<i>rplF</i>	-126	-102	137	161	50S ribosomal protein L6
0,00424	midg2331_rs04890	N/A	-81	-72	115	124	ShIB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein
0,00461	midg2331_rs08340	<i>crcB</i>	-16	35	119	163	chromosome condensation protein CcrB
0,00467	midg2331_rs00705	N/A	47	97	101	160	membrane protein
0,00484	midg2331_rs00105	<i>ftsQ</i>	-192	-151	105	148	cell division protein FtsQ
0,00489	midg2331_rs05405	<i>yajC</i>	-51	-8	128	159	preprotein translocase subunit YajC
0,00499	midg2331_rs00265	<i>grxA</i>	76	99	132	156	glutaredoxin GrxA family
0,00512	midg2331_rs04095	N/A	-177	-155	145	168	hypothetical protein
0,00515	midg2331_rs00250	N/A	-87	-74	135	146	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase
0,00523	midg2331_rs03470	N/A	11	25	143	157	putative acetyltransferase
0,00530	midg2331_rs01985	<i>ribH</i>	10	38	133	161	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
0,00558	midg2331_rs09040	<i>atpI</i>	-96	-64	109	147	F0F1 ATP synthase subunit I
0,00559	midg2331_rs01920	<i>corC_2</i>	-194	-179	15	31	magnesium/cobalt transporter CorC
0,00565	midg2331_rs06780	<i>ptsB</i>	7	22	155	171	PTS trehalose transporter subunits IIBC
0,00569	midg2331_rs05340	<i>dsbE2</i>	-75	-58	144	164	dihydroneopterin aldolase
0,00572	midg2331_rs02165	<i>pbpG</i>	39	47	145	153	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
0,00654	midg2331_rs02010	N/A	19	68	111	168	sodium:proton symporter
0,00669	midg2331_rs07555	<i>corC_3</i>	-123	-111	137	149	HlyC/CorC family transporter
0,00678	midg2331_rs08765	<i>mutS</i>	-90	-56	139	169	DNA mismatch repair protein MutS
0,00688	midg2331_rs06175	<i>fldA</i>	-10	15	127	156	flavodoxin FldA
0,00749	midg2331_rs08540	<i>selB</i>	-23	0	94	121	selenocysteine-specific translation elongation factor
0,00763	midg2331_rs00295	<i>rlmL</i>	-100	-93	21	28	bifunctional 23S rRNA guanine
0,00841	midg2331_rs04415	<i>yacG</i>	68	80	16	28	DNA gyrase inhibitor YacG
0,00863	midg2331_rs00290	<i>narP</i>	50	64	89	104	DNA-binding response regulator
0,00897	midg2331_rs05255	<i>prlC</i>	72	95	136	159	oligopeptidase A
0,00917	midg2331_rs06155	N/A	-22	41	85	150	ABC transporter ATP-binding protein
0,00945	midg2331_rs00715	<i>leuC</i>	-42	-13	136	164	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
0,00958	midg2331_rs10840	<i>ubiE</i>	-173	-163	21	31	ubiquinone/menaquinone biosynthesis Methyltransferase
0,00965	midg2331_rs08505	<i>wecA</i>	14	37	117	150	Undecaprenyl-phosphatealpha-N-acetylglucosaminyltransferase
0,00969	midg2331_rs02905	<i>fieF</i>	34	96	104	158	iron transporter
0,00970	midg2331_rs00285	<i>fixI</i>	83	100	112	126	ferredoxin
0,00984	midg2331_rs00410	<i>exbB3</i>	-14	86	108	172	TonB-system energizer ExbB
0,00986	midg2331_rs08245	<i>dsbE1</i>	16	24	56	64	DsbE family thiol:disulfide interchange protein
0,00998	midg2331_rs05245	<i>priA</i>	-126	-72	110	165	primosomal protein N'
0,01005	midg2331_rs08345	N/A	-39	-15	130	158	MFS transporter

Com o intuito de verificar se os alvos preditos para cada sRNA apresentavam funções biológicas relacionadas, foi produzida uma rede de interação entre os mRNAs alvos, com base no genoma de *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20. A partir desta rede foi realizado um enriquecimento funcional para visualizar funções biológicas ocultas para cada sRNA. A rede de interação entre os mRNAs foi considerada significativa quando o número de interações retornava um valor de *p-value* para a interação menor do que 0,05 ($P \leq 0,05$), medido de acordo com a probabilidade cumulativa dentro de um modelo de distribuição hipergeométrica (FRANCESCHINI et al., 2013). Paralelamente, foi realizada a anotação funcional para cada mRNA alvo com base nos dados disponibilizados no banco de dados Kegg. A rede produzida para GcvB revelou uma complexa rede de interação entre 42 (Figura 22A) dos 73 mRNAs preditos como alvos (Tabela 10). Foram observadas 38 associações distintas entre os mRNAs, o que corresponde a um número de interações significativamente superior (*p-value*: 0,0412 – $P \leq 0,05$) ao valor esperado (28 associações) caso as interações ocorressem ao acaso. Após o enriquecimento da rede com 20 novos mRNAs foi obtida uma rede com 280 interações. Este número foi superior ao número de interações preditas para associações ao acaso (159 interações) e retornou um valor de *p-value* $< 1,0^{-16}$ ($P \leq 0,05$). O enriquecimento funcional foi hábil em revelar processos biológicos ocultos para os mRNAs alvos preditos (Figura 22C) envolvidos com o metabolismo de compostos nitrogenados e com fatores associados à tradução. Estes dados foram de encontro com a anotação funcional manual (Figura 22B) realizada para os mRNAs preditos, que evidenciou uma atuação dos mRNAs alvos prioritariamente no processamento da informação ambiental (26%), genética (30%) e no metabolismo (33%). Dentre os mRNAs relacionados com o metabolismo, foram evidenciados especialmente funções com o metabolismo de aminoácidos (35%), energético (15%), de cofatores e vitaminas (15%) e de nucleotídeos (12%).

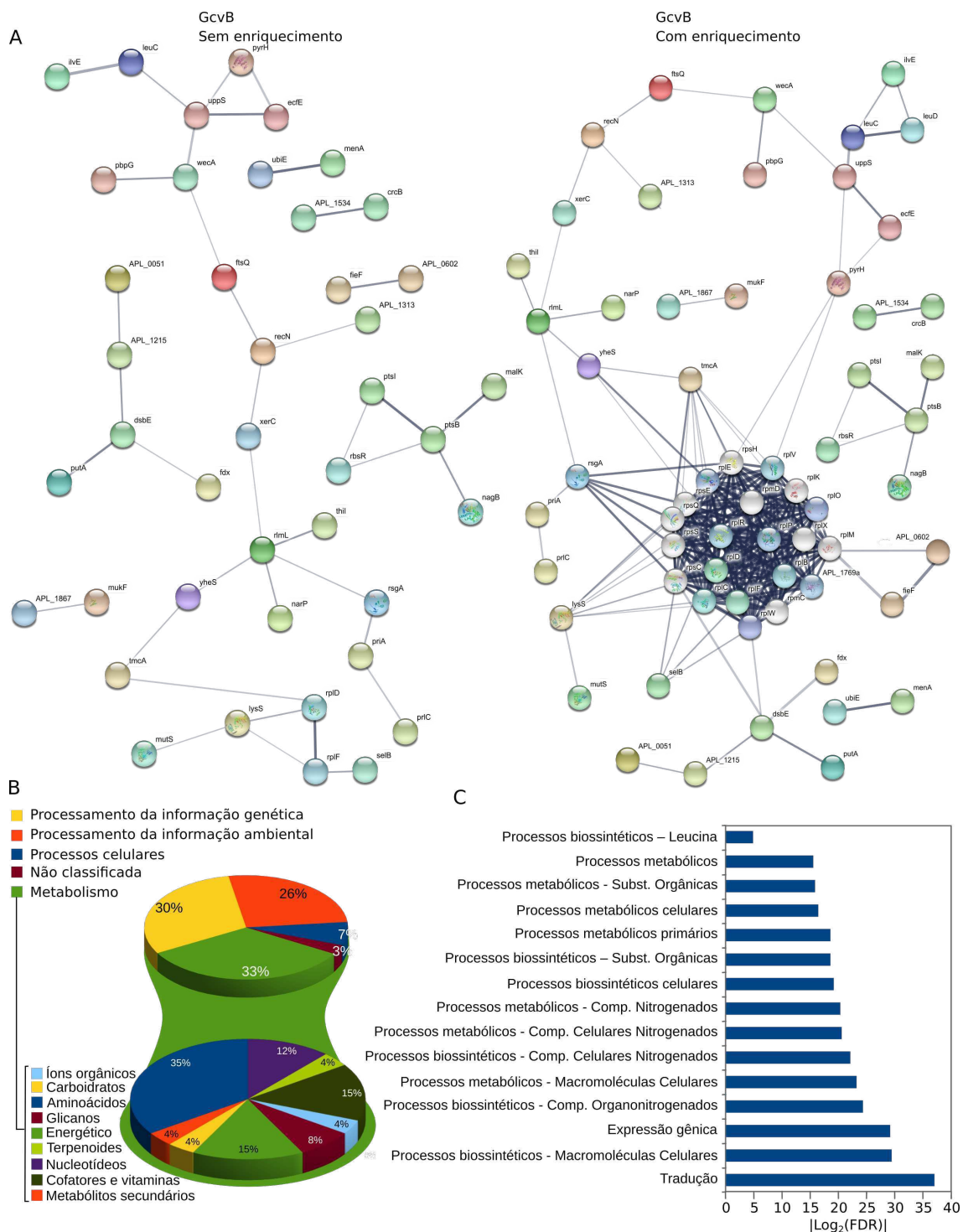


Figura 22.A – Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para GcvB. A sequência de aminoácidos obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos mRNAs foram carregadas no banco de dados STRING e analisadas utilizando as configurações padrões. Nós desconectados foram omitidos da exibição da rede. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. **B** – Anotação funcional para mRNAs alvos preditos a partir do banco de dados Kegg. As funções moleculares dos mRNAs foi anotada de acordo com os ortólogos Kegg (KO) para genes e proteínas experimentalmente caracterizadas. A busca foi realizada com base na nomenclatura dos genes anotadas para o genoma de MIDG2331. **C** – Processos biológicos implicados na rede de interação dos mRNAs: o enriquecimento funcional da rede de mRNAs revelou processos biológicos baseados na ontologia dos genes (GO). Todos os processos biológicos foram plotados de acordo com o módulo do \log_2 da taxa de falso positivo (FDR).

Os mRNAs alvos preditos para RNA01 estão apresentados na Tabela 11. Foram preditos 32 potenciais alvos com $p\text{-value} \leq 0,01$. A rede de interação entre os mRNAs alvos (Figura 23A) obteve significativamente ($p\text{-value} 0,0308 - P \leq 0,05$) maior número de interações (12) do que o esperado (4) para o número de nós. Após o enriquecimento da rede com 20 novos nós foi obtida uma rede com 91 interações entre os mRNAs. Este número foi superior ao número de interações preditas para associações ao acaso (54 interações) e retornou um valor de $p\text{-value} < 1,99^{-6}$ ($P \leq 0,05$). O enriquecimento funcional foi hábil em revelar processos biológicos ocultos para os mRNAs alvos preditos envolvidos com a estrutura da membrana externa e com as vias metabólicas centrais (Figura 23C). Similarmente, a anotação funcional manual (Figura 23B) realizada para os mRNAs preditos, evidenciou uma atuação dos mRNAs alvos prioritariamente no metabolismo, sendo observado alvos envolvidos no metabolismo de aminoácidos (21%), glicanos (16%), energético (16%), carboidratos (16%), cofatores e vitaminas (16%), terpenoides (5%), fenazina (5%) e lipídios (5%).

Tabela 11. Alvos preditos para RNA01 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.

p-value	Locus tag	Gene	Posição mRNA		Posição sRNA		Anotação
			Início	Fim	Início	Fim	
0.0000	midg2331_rs03350	<i>sbcB</i>	21	106	1	86	exonuclease I
0.0000	midg2331_rs06240	<i>malT</i>	131	142	49	60	ATP-dependent transcriptional regulator
0.0009	midg2331_rs07970	<i>wzx</i>	263	286	34	57	flippase Wzx
0.0012	midg2331_rs00170	<i>engD</i>	101	116	71	86	GTP-dependent nucleic acid-binding protein
0.0023	midg2331_rs01930	<i>glpF</i>	231	273	40	78	glycerol uptake facilitator protein
0.0027	midg2331_rs00225	<i>ribF</i>	241	248	35	42	riboflavin biosynthesis protein
0.0027	midg2331_rs00035	<i>lpxB</i>	240	274	6	45	lipid-A-disaccharide synthase
0.0032	midg2331_rs01040	<i>thtB</i>	40	63	34	57	threonine efflux protein
0.0032	midg2331_rs09900	<i>xerC_2</i>	252	272	34	53	integrase/recombinase XerC
0.0033	midg2331_rs02135	<i>uppS</i>	60	73	34	57	undecaprenyl pyrophosphate synthetase
0.0037	midg2331_rs02205	<i>smpA</i>	138	161	36	59	outer membrane protein assembly factor
0.0040	midg2331_rs00280	<i>ygfZ</i>	178	202	53	77	tRNA-modifying protein YgfZ
0.0042	midg2331_rs02740	N/A	95	112	35	60	putative pyridoxine biosynthesis protein
0.0043	midg2331_rs11135	N/A	266	275	48	57	glycerate dehydrogenase
0.0043	midg2331_rs06670	<i>mdh</i>	176	230	7	59	malate dehydrogenase
0.0052	midg2331_rs01755	<i>ppc</i>	149	165	34	50	phosphoenolpyruvate carboxylase
0.0052	midg2331_rs07935	<i>rpsU</i>	180	194	41	55	30S ribosomal protein s21
0.0057	midg2331_rs10005	<i>menB</i>	120	141	34	56	dihydroxynaphthoic acid synthase
0.0063	midg2331_rs08040	<i>glmM</i>	195	209	73	85	phosphoglucosamine mutase
0.0064	midg2331_rs05820	<i>recX</i>	1	33	50	83	putative regulatory protein RecX-like protein
0.0069	midg2331_rs00790	<i>nqrE</i>	260	285	34	58	Na ⁺ -transporting NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit
0.0075	midg2331_rs10675	<i>dtd</i>	4	30	34	60	D-aminoacyl-tRNA deacylase
0.0075	midg2331_rs05845	<i>trpG</i>	173	184	73	85	anthranilate synthase component II
0.0079	midg2331_rs10885	<i>brnQ</i>	134	152	35	55	branched-chain amino acid permease
0.0086	midg2331_rs07300	<i>ftsY</i>	202	242	35	80	signal recognition particle-docking protein
0.0087	midg2331_rs02165	<i>pbpG</i>	215	235	19	38	penicillin-binding protein 5
0.0090	midg2331_rs00390	<i>recR</i>	190	196	49	55	recombination protein RecR
0.0093	midg2331_rs08085	<i>plsC</i>	197	237	34	73	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
0.0097	midg2331_rs04135	<i>gyrB</i>	44	56	48	60	DNA gyrase subunit B
0.0098	midg2331_rs06770	<i>argF</i>	74	82	50	58	ornithine carbamoyltransferase
0.0100	midg2331_rs08345	N/A	163	173	35	45	putative transport system permease protein
0.0100	midg2331_rs00440	<i>trxB</i>	202	243	37	80	thioredoxin reductase

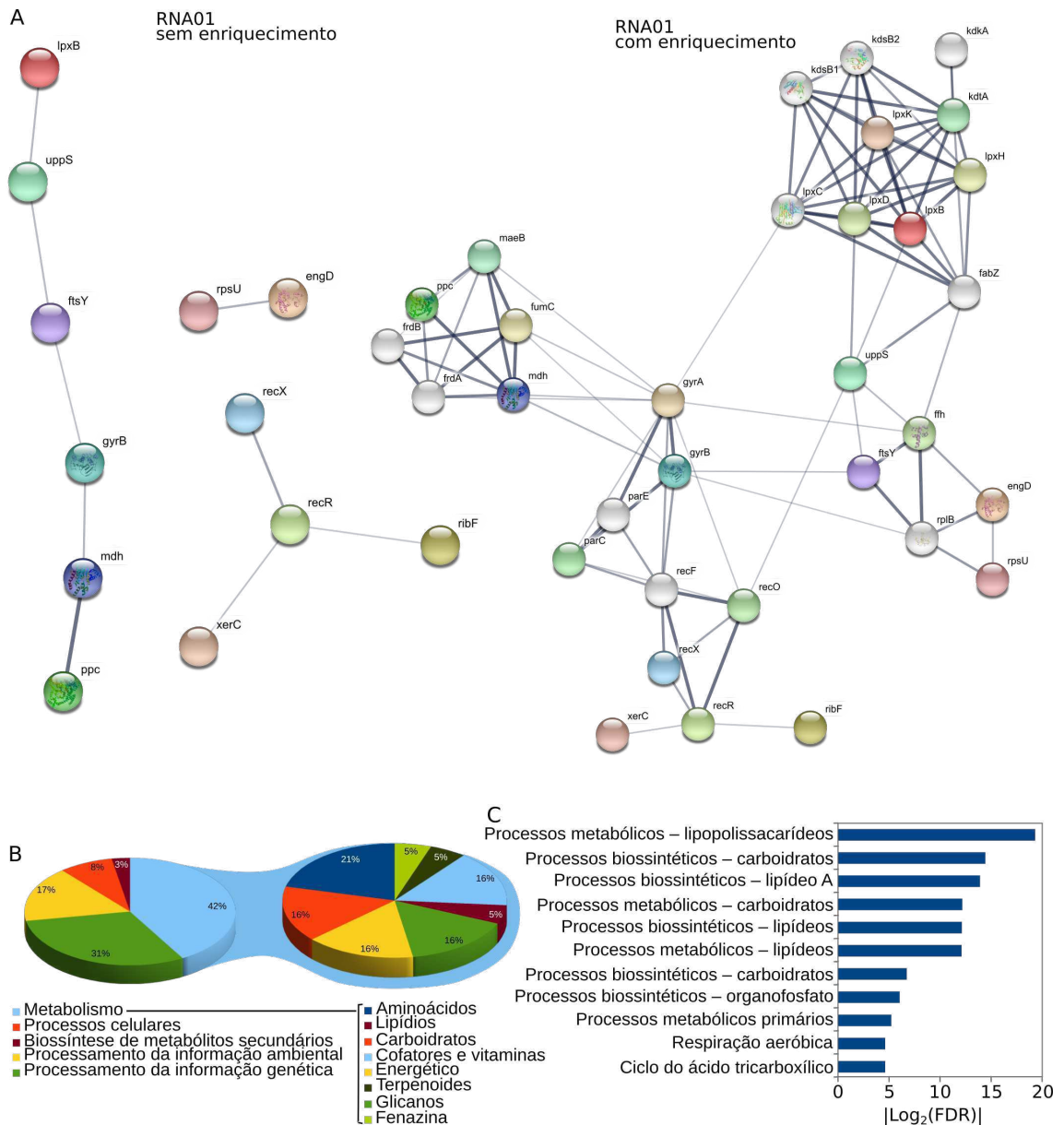


Figura 23. **A** – Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para RNA01. A sequência de aminoácidos obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos mRNAs foram carregadas no banco de dados STRING e analisadas utilizando as configurações padrões. Nós desconectados foram omitidos da exibição da rede. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. **B** – Anotação funcional para mRNAs alvos preditos a partir do banco de dados Kegg. As funções moleculares dos mRNAs foi anotada de acordo com os ortólogos Kegg (KO) para genes e proteínas experimentalmente caracterizadas. A busca foi realizada com base na nomenclatura dos genes anotadas para o genoma de MIDG2331. **C** – Processos biológicos implicados na rede de interação dos mRNAs: o enriquecimento funcional da rede de mRNAs revelou processos biológicos baseados na ontologia dos genes (GO). Todos os processos biológicos foram plotados de acordo com o módulo do \log_2 da taxa de falso positivo (FDR).

RNA02 revelou uma complexa rede de interação entre 26 (Figura 24A) dos 52 mRNAs preditos como alvos (Tabela 12). Foram observadas 17 associações distintas entre os mRNAs, o que corresponde a um número de interações significativamente superior (*p-value*: 0,00332 – $P \leq 0,05$) ao valor esperado (8 associações), caso as interações ocorressem ao acaso. Após o enriquecimento da rede com 20 novos mRNAs foi obtida uma rede com 88 interações entre os mRNAs. Este número foi superior ao número de interações preditas para associações ao acaso (46 interações) e retornou um valor de *p-value* $< 3,7^{-8}$ ($P \leq 0,05$). O enriquecimento funcional revelou processos biológicos para os mRNAs alvos preditos (Figura 24C) associados com processos metabólicos e biossintéticos de lipídios, carboidratos e aminoácidos. A anotação funcional manual (Figura 24B) mostrou que os mRNAs alvos preditos para RNA02 estão associados com processos metabólicos variados, ressaltando-se o metabolismo de aminoácidos, glicanos e de síntese de enzimas da classe hidrolase (Figura 24B).

Tabela 12. Alvos preditos para RNA02 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.

p-value	Locus tag	Gene	Posição mRNA		Posição sRNA		Anotação
			Início	Fim	Início	Fim	
0.0000	midg2331_rs08910	<i>glmS</i>	-193	-169	42	55	glucosamine—fructose-6-phosphate aminotransferase
0.0000	midg2331_rs11070	<i>hisF</i>	-31	-19	38	50	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF
0.0001	midg2331_rs10920	N/A	-9	8	31	51	DoxX family protein
0.0001	midg2331_rs09325	<i>rfaD</i>	50	96	15	48	ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase
0.0001	midg2331_rs02410	N/A	-168	-147	25	47	YcgN family cysteine cluster protein
0.0001	midg2331_rs00825	<i>rdgC</i>	-195	-181	35	49	recombination associated protein
0.0002	midg2331_rs06085	<i>nfnB</i>	-131	-108	30	55	NADP- H-dependent oxidoreductase
0.0003	midg2331_rs02810	N/A	-55	-43	43	55	MexH family multidrug efflux RND transporter periplasmic
0.0003	midg2331_rs01005	N/A	-10	9	30	49	hypothetical protein
0.0004	midg2331_rs05375	N/A	-13	5	34	55	hypothetical protein
0.0004	midg2331_rs10900	N/A	-100	-89	41	52	hypothetical protein
0.0005	midg2331_rs09920	N/A	-5	58	1	55	hypothetical protein
0.0006	midg2331_rs00155	N/A	1	41	4	38	DUF805 domain-containing protein
0.0009	midg2331_rs08025	<i>aqpZ</i>	-54	-45	44	53	aquaporin Z
0.0012	midg2331_rs05380	N/A	-14	6	33	55	hypothetical protein
0.0013	midg2331_rs11155	N/A	-11	6	33	54	hypothetical protein
0.0015	midg2331_rs06075	N/A	56	88	15	48	putative oxidoreductase
0.0015	midg2331_rs11020	<i>purC</i>	26	58	30	55	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase
0.0016	midg2331_rs02250	<i>mreB</i>	-47	-32	4	19	rod shape-determining protein
0.0017	midg2331_rs10340	<i>ptrA</i>	-149	-114	14	51	Pitriylsin / protease III
0.0018	midg2331_rs05465	<i>trxA</i>	-11	26	15	51	thioredoxin
0.0022	midg2331_rs04585	N/A	-8	31	10	51	hydrolase of the alpha/beta superfamily protein
0.0022	midg2331_rs04430	<i>apfC</i>	24	32	45	53	type II secretion system F family protein
0.0023	midg2331_rs01965	<i>glpC_1</i>	-70	-41	21	48	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase,subunit C
0.0025	midg2331_rs03900	<i>ispE</i>	-125	-113	40	52	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase
0.0026	midg2331_rs00455	<i>nudC</i>	6	51	10	54	NADH pyrophosphatase diphosphatase
0.0027	midg2331_rs03400	<i>metB</i>	-17	21	12	55	cystathionine gamma-synthase
0.0030	midg2331_rs04415	<i>yacG</i>	-8	16	30	51	DNA gyrase inhibitor
0.0033	midg2331_rs06780	<i>ptsB</i>	20	68	12	52	phosphotransferase system enzyme II,sucrose-specific, factor IIBC
0.0034	midg2331_rs08805	<i>ycnE</i>	-10	4	35	51	antibiotic biosynthesis monooxygenase
0.0036	midg2331_rs01940	<i>lon</i>	-189	-163	28	50	ATP-dependent protease LA
0.0041	midg2331_rs10265	N/A	-10	7	32	50	hypothetical protein
0.0043	midg2331_rs09320	N/A	-83	-76	45	52	ribonucleoside-triphosphate reductase
0.0044	midg2331_rs04485	N/A	-190	-153	13	53	hypothetical protein
0.0045	midg2331_rs06120	<i>adh1_3</i>	-10	8	31	51	putative alcohol dehydrogenase class III
0.0048	midg2331_rs00115	<i>ftsZ</i>	-113	-104	41	50	cell division protein
0.0049	midg2331_rs07335	<i>artI</i>	-112	-91	34	51	arginine ABC transporter substrate-binding protein
0.0053	midg2331_rs05990	<i>hisS</i>	-190	-154	13	50	histidyl-tRNA synthetase
0.0056	midg2331_rs03315	<i>vapB1</i>	78	91	36	49	Antitoxin VapB1
0.0057	midg2331_rs02035	<i>rseA</i>	-147	-127	34	53	sigma-E factor negative regulatory protein
0.0058	midg2331_rs06155	N/A	-9	-1	43	51	ABC transporter, putative ATP-binding protein
0.0059	midg2331_rs02205	<i>smpA</i>	-106	-75	14	47	outer membrane protein assembly factor BamE
0.0060	midg2331_rs05590	N/A	-199	-168	4	31	LPS export ABC transporter permease LptG
0.0079	midg2331_rs10335	<i>rluC</i>	-45	-21	14	38	23S rRNA pseudouridine synthase RluC
0.0081	midg2331_rs07705	N/A	-34	2	15	54	Type I restriction enzyme EcoAI specificity protein
0.0083	midg2331_rs03795	<i>lgbB</i>	-46	-21	5	33	putative effector of murein hydrolase
0.0085	midg2331_rs05210	<i>lsgF</i>	-195	-155	20	52	putative UDP-galactose—lipooligosaccharide galactosyltransferase
0.0091	midg2331_rs07510	N/A	64	100	14	49	hypothetical protein
0.0093	midg2331_rs10295	<i>dapE</i>	-15	14	13	54	succinyl-diaminopimelate desuccinylase
0.0098	midg2331_rs00920	<i>rdgC</i>	17	56	9	55	recombination associated protein
0.0100	midg2331_rs01800	<i>glgC</i>	-11	12	16	52	glucose-1-phosphate adenyllyltransferase

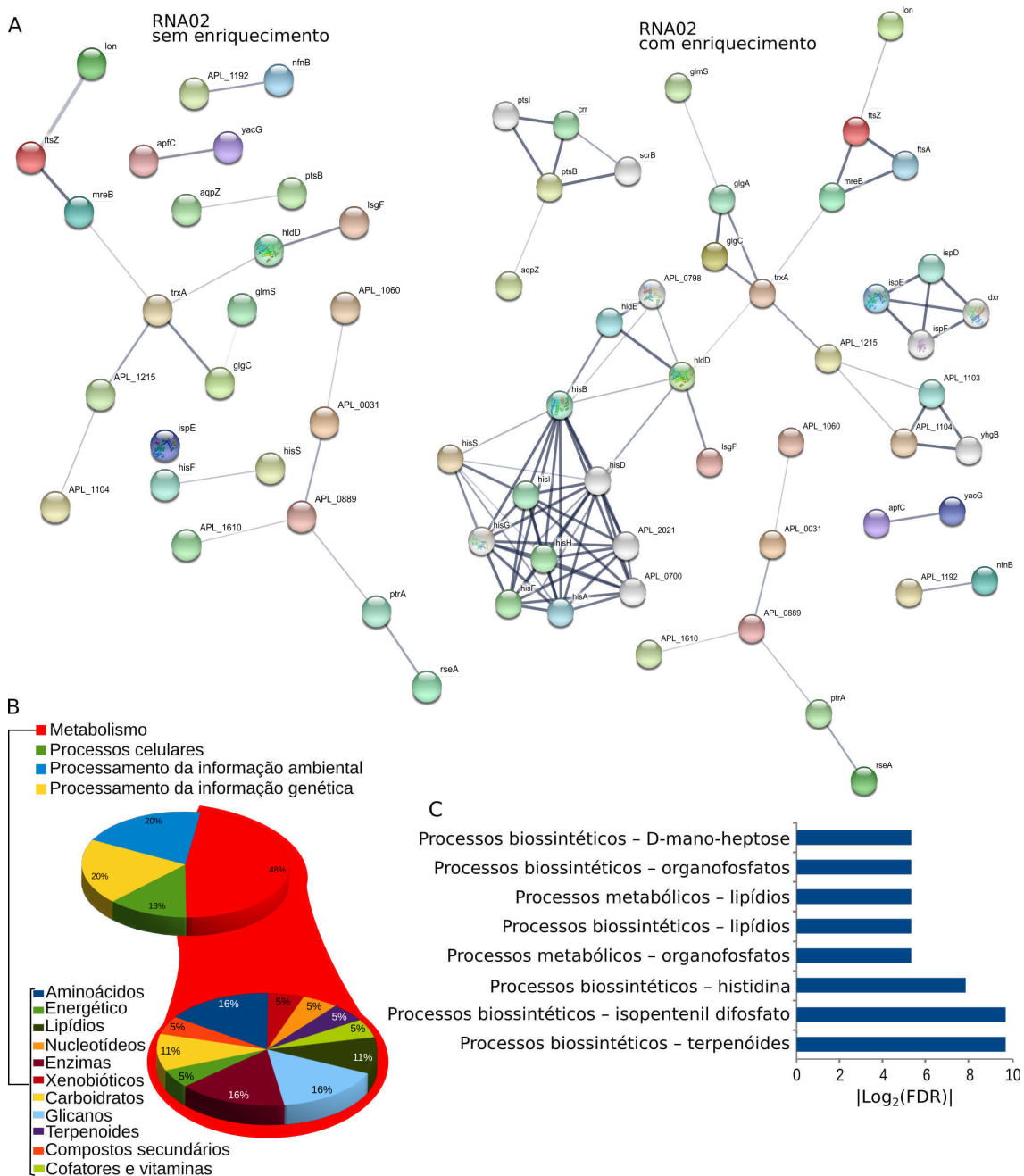


Figura 24. **A** – Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para RNA02. A sequência de aminoácidos obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos mRNAs foram carregadas no banco de dados STRING e analisadas utilizando as configurações padrões. Nós desconectados foram omitidos da exibição da rede. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. **B** – Anotação funcional para mRNAs alvos preditos a partir do banco de dados Kegg. As funções moleculares dos mRNAs foi anotada de acordo com os ortólogos Kegg (KO) para genes e proteínas experimentalmente caracterizadas. A busca foi realizada com base na nomenclatura dos genes anotadas para o genoma de MIDG2331. **C** – Processos biológicos implicados na rede de interação dos mRNAs: o enriquecimento funcional da rede de mRNAs revelou processos biológicos baseados na ontologia dos genes (GO). Todos os processos biológicos foram plotados de acordo com o módulo do \log_2 da taxa de falso positivo (FDR).

Foram preditos 72 mRNAs alvos para Arrc14 com $p\text{-value} \leq 0,01$ (Tabela 13). A rede predita para Arrc14 revelou interação entre 35 (Figura 25A) mRNAs, perfazendo 33 associações distintas entre eles, o que corresponde a um número de interações significativamente superior ($p\text{-value}$: 0,00472 – $P \leq 0,05$) ao valor esperado (20 associações) caso as interações ocorressem ao acaso. Após o enriquecimento da rede com 20 novos mRNAs foi obtida uma rede com 251 interações entre os mRNAs. Este número foi superior ao número de interações preditas para associações ao acaso (137 interações) e retornou um valor de $p\text{-value} < 1,0^{-16}$ ($P \leq 0,05$). O enriquecimento funcional revelou uma forte atuação de Arrc14 nos processos de expressão gênica, em especial na tradução, bem como no metabolismo primário, de componentes nitrogenados e na síntese de macromoléculas (Figura 25C). A anotação funcional dos mRNAs preditos apontou duas linhas de atuação evidentes: metabólica (42%) e processamento da informação genética (31%). Dentro do metabolismo, mRNAs envolvidos com o metabolismo de aminoácidos (26%), energético (19%) e carboidratos (13%) foram majoritários (Figura 25B) para os mRNAs preditos. Para o processamento da informação genética observou-se uma atuação de alvos nos processos de tradução (35%), recombinação e reparo (35%), transcrição (20%) e condensação, dobra e degradação de ácidos nucléicos (10%).

Tabela 13. Alvos preditos para Arrc14 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.

p-value	Locus tag	Gene	Posição mRNA		Posição sRNA		Anotação
			Início	Fim	Início	Fim	
0.0000	midg2331_rs04330	<i>sdaA</i>	-13	17	7	32	L-serine dehydratase
0.0000	midg2331_rs07820	<i>napG</i>	-162	-146	132	148	ferredoxin-type protein NapG
0.0000	midg2331_rs10185	<i>birA</i>	34	52	135	153	biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase
0.0001	midg2331_rs06295	<i>N/A</i>	-123	-114	134	143	hypothetical protein
0.0001	midg2331_rs00115	<i>ftsZ</i>	30	52	64	86	cell division protein
0.0003	midg2331_rs06670	<i>mdh</i>	26	40	134	149	malate dehydrogenase
0.0003	midg2331_rs11040	<i>N/A</i>	-153	-132	54	74	transposase IS200-like protein
0.0005	midg2331_rs07715	<i>N/A</i>	1	13	133	145	Type I restriction-modification system S subunit
0.0005	midg2331_rs04005	<i>sapC</i>	-62	-43	133	153	antimicrobial peptide ABC transporter permease SapC
0.0005	midg2331_rs09130	<i>RbsK2</i>	14	29	133	147	ribokinase
0.0007	midg2331_rs00665	<i>rnhB</i>	-143	-114	56	84	ribonuclease HII
0.0009	midg2331_rs10205	<i>pqiA</i>	-192	-155	2	43	paraquat-inducible protein A
0.0010	midg2331_rs08795	<i>N/A</i>	23	33	138	148	hypothetical protein
0.0010	midg2331_rs05985	<i>N/A</i>	-166	-153	132	145	hypothetical protein
0.0011	midg2331_rs01730	<i>N/A</i>	58	91	126	153	glmZ sRNA-inactivating NTPase sRNA-inactivating NTPase
0.0011	midg2331_rs11110	<i>rbsK3</i>	71	85	132	148	sugar kinase
0.0014	midg2331_rs00795	<i>nqrF</i>	-19	9	124	150	NADH:ubiquinone reductase Na ⁺ -transporting subunit F
0.0015	midg2331_rs00040	<i>sohB</i>	53	78	123	149	protease SohB
0.0020	midg2331_rs10675	<i>ddd</i>	16	45	123	149	D-aminoacyl-tRNA deacylase
0.0022	midg2331_rs01665	<i>dsbB</i>	39	48	12	21	disulfide bond formation protein B
0.0022	midg2331_rs05505	<i>ompW</i>	64	81	132	152	outer membrane protein ompW precursor
0.0024	midg2331_rs07340	<i>artP</i>	-30	-16	2	16	arginine ABC transporter ATP-binding protein ArtP
0.0025	midg2331_rs09825	<i>N/A</i>	-7	5	22	34	iron ABC transporter substrate-binding protein
0.0025	midg2331_rs11070	<i>hisF</i>	-64	-55	137	147	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF
0.0027	midg2331_rs08485	<i>rffC</i>	-158	-142	52	67	Lipopolysaccharide biosynthesis protein RfC
0.0028	midg2331_rs01610	<i>moeB_2</i>	66	76	135	144	molybdopterin biosynthesis protein
0.0029	midg2331_rs03005	<i>glpX</i>	72	85	56	69	GlpX-like protein
0.0030	midg2331_rs09700	<i>rplP</i>	-142	-116	127	149	50S ribosomal protein L17
0.0031	midg2331_rs03360	<i>asnS</i>	35	44	133	142	asparaginyl-tRNA synthetase
0.0031	midg2331_rs03855	<i>N/A</i>	20	51	62	86	hypothetical protein
0.0034	midg2331_rs09705	<i>rpmC</i>	-117	-88	123	142	ribosomal protein L29
0.0036	midg2331_rs03610	<i>tgt</i>	-108	-101	138	145	tRNA guanosine 34 transglycosylate Tgt
0.0037	midg2331_rs06280	<i>N/A</i>	0	25	15	42	carbon starvation protein A
0.0039	midg2331_rs00635	<i>N/A</i>	82	98	136	151	glyoxalase II family protein
0.0040	midg2331_rs08750	<i>mdaA</i>	-144	-116	14	40	penicillin-binding protein 3
0.0040	midg2331_rs04560	<i>truA</i>	70	95	60	87	tRNA pseudouridine synthase A
0.0041	midg2331_rs10145	<i>cysD</i>	-64	-25	127	152	sulfate adenylyltransferase subunit CysD
0.0044	midg2331_rs01350	<i>modC</i>	46	55	133	143	molybdenum ABC transporter, ATP-binding protein
0.0048	midg2331_rs06045	<i>N/A</i>	-198	-180	19	36	LysR family transcriptional regulator
0.0053	midg2331_rs06205	<i>N/A</i>	-77	-63	128	144	putative flavoprotein
0.0053	midg2331_rs01545	<i>ybgC</i>	39	50	131	144	tol-pal system-associated acyl-CoA thioesterase
0.0059	midg2331_rs01520	<i>moeB_1</i>	42	48	136	142	molybdopterin biosynthesis protein
0.0061	midg2331_rs01325	<i>gpt</i>	28	35	35	42	xanthine-guanine phosphoribosyltransferase
0.0061	midg2331_rs01455	<i>potB</i>	-21	-8	54	68	spermidine/putrescine transport system permease protein
0.0064	midg2331_rs07335	<i>artI</i>	-153	-133	132	151	arginine ABC transporter substrate-binding protein
0.0065	midg2331_rs01540	<i>N/A</i>	67	95	6	33	cyd operon protein YbgE
0.0069	midg2331_rs04605	<i>N/A</i>	-115	-104	131	144	ABC transporter permease protein
0.0070	midg2331_rs08710	<i>N/A</i>	-84	-58	131	149	menaquinone-dependent protoporphyrinogen IX dehydrogenase
0.0073	midg2331_rs05870	<i>N/A</i>	-35	-24	25	36	hypothetical protein
0.0073	midg2331_rs00875	<i>rnfE</i>	-95	-69	127	149	Na-translocating NADH-quinone reductase
0.0074	midg2331_rs02580	<i>lepB</i>	-119	-109	134	144	signal peptidase I
0.0075	midg2331_rs03460	<i>moaE</i>	-132	-123	159	168	molybdopterin converting factor subunit 2
0.0076	midg2331_rs09615	<i>menD</i>	27	50	118	143	menaquinone biosynthesis protein
0.0079	midg2331_rs08950	<i>SlyX</i>	-49	-31	131	148	protein SlyX
0.0079	midg2331_rs02905	<i>fteF</i>	82	94	14	26	iron transporter
0.0079	midg2331_rs05385	<i>N/A</i>	-11	4	2	20	hypothetical protein
0.0079	midg2331_rs08025	<i>aqpZ</i>	-198	-189	134	143	aquaporin Z
0.0080	midg2331_rs01990	<i>greA1</i>	-44	-35	131	140	transcription elongation factor
0.0080	midg2331_rs02980	<i>N/A</i>	47	54	136	143	Putative neutral zinc metallopeptidase
0.0084	midg2331_rs07520	<i>N/A</i>	-91	-81	139	149	hypothetical protein
0.0085	midg2331_rs05295	<i>menF</i>	-198	-181	7	24	menaquinone-specific isochorismate synthase
0.0086	midg2331_rs03440	<i>torY</i>	17	36	132	152	cytochrome c-type protein TorY
0.0089	midg2331_rs00480	<i>sirA</i>	-47	-22	16	42	sulfurtransferase Tusa
0.0089	midg2331_rs03900	<i>ispE</i>	-141	-122	128	152	5-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase
0.0090	midg2331_rs00280	<i>ygfZ</i>	-39	19	18	86	tRNA-modifying protein YgfZ
0.0090	midg2331_rs01280	<i>thrA</i>	-111	-100	130	145	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase 1
0.0091	midg2331_rs09115	<i>rbsA</i>	-186	-171	3	20	ribose transport ATP-binding protein
0.0092	midg2331_rs10885	<i>brnQ</i>	53	68	136	150	branched-chain amino acid permease
0.0095	midg2331_rs01850	<i>nfo</i>	32	44	128	142	endonuclease IV
0.0097	midg2331_rs02175	<i>argG</i>	-45	-33	13	24	argininosuccinate synthetase
0.0099	midg2331_rs06215	<i>aphA</i>	-138	-128	29	40	AphA (smp-like) protein
0.0101	midg2331_rs05875	<i>ruvC</i>	-61	-55	137	143	crossover junction endodeoxyribonuclease

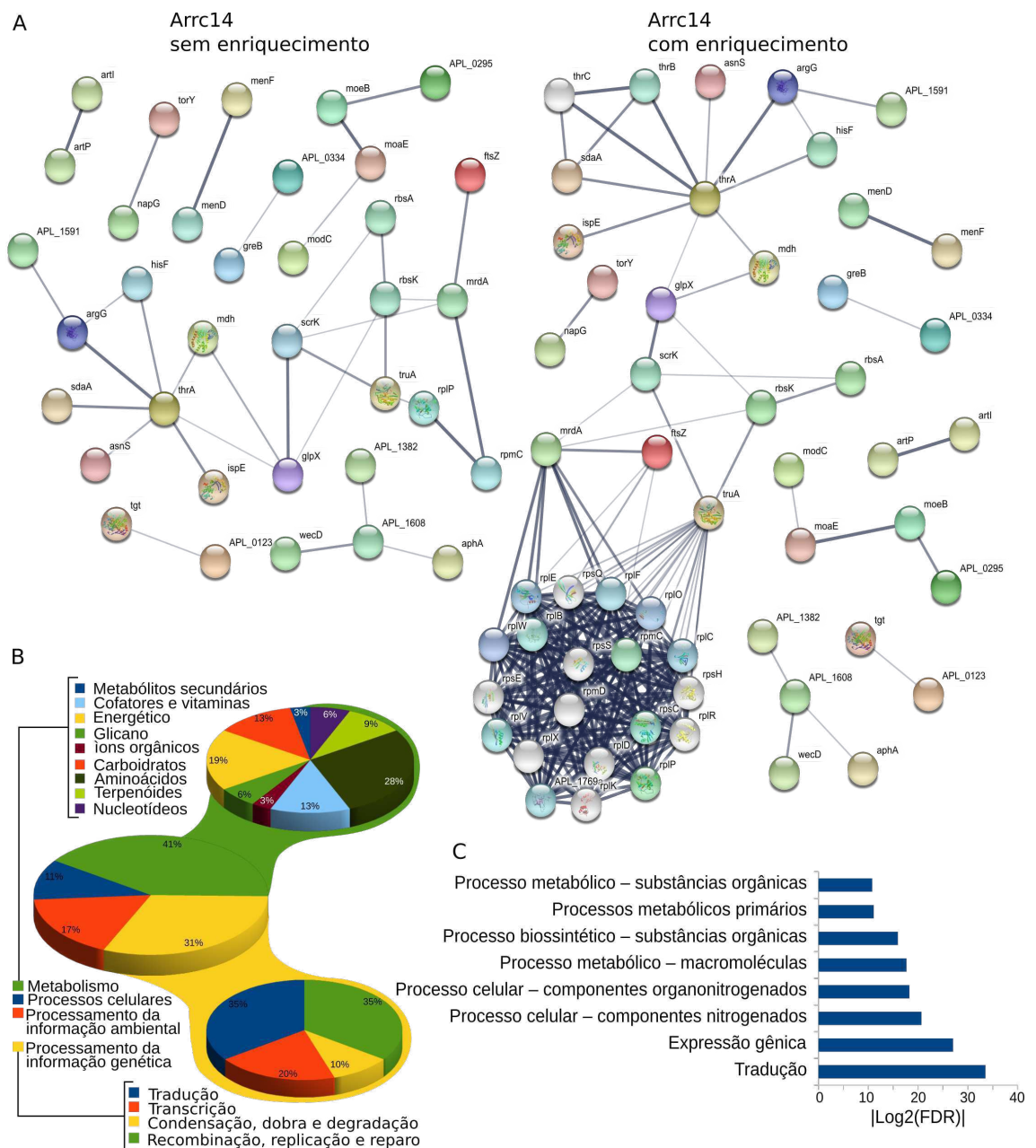


Figura 25. A – Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para Arcc14. A sequência de aminoácidos obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos mRNAs foram carregadas no banco de dados STRING e analisadas utilizando as configurações padrões. Nós desconectados foram omitidos da exibição da rede. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. B – Anotação funcional para mRNAs alvos preditos a partir do banco de dados Kegg. As funções moleculares dos mRNAs foi anotada de acordo com os ortólogos Kegg (KO) para genes e proteínas experimentalmente caracterizadas. A busca foi realizada com base na nomenclatura dos genes anotadas para o genoma de MIDG2331. C – Processos biológicos implicados na rede de interação dos mRNAs: o enriquecimento funcional da rede de mRNAs revelou processos biológicos baseados na ontologia dos genes (GO). Todos os processos biológicos foram plotados de acordo com o módulo do log₂ da taxa de falso positivo (FDR).

Foram identificados 67 potenciais alvos para Arrc16 entre os mRNAs de MIDG2331 (Tabela 14). Destes, 38 apresentaram uma complexa rede de interação com a formação de 50 associações entre mRNAs, obtendo-se um *p-value* de $1,42^{-7}$ ($P \leq 0,05$). O número estimado de associações para 35 nós, para uma rede de interações ao acaso, foi estimado em 22, mostrando que Arrc16 possui uma rede significativa de interações. Arrc16 foi o único sRNA analisado cuja rede *per se* apresentou uma rota de enriquecimento funcional, sem a necessidade de ampliação do número de nós. Foi observado *in silico* que Arrc16 interage com mRNAs envolvidos no metabolismo de nitrogênio (FDR 0,0473), conforme pode ser observado na rede sem enriquecimento (região sombreada) apresentada na Figura 26A. A rota para metabolismo do nitrogênio identificada pela rede de interações está representada na Figura 27. Os genes *napA* e *napB* estão envolvidos na conversão de nitrato em nitrito e o gene *nrfA* converte nitrito em amônia. Após o enriquecimento da rede com a adição de 20 nós, revelou-se o envolvimento de Arrc16 em mRNAs associados com processos biossintéticos e metabólicos primários e traducionais (Figura 26C). O enriquecimento ampliou as associações entre mRNAs de 50 para 215 interações, sendo esperado 134 interações para associações ao acaso na rede formada. A análise funcional dos mRNAs preditos associou os alvos com funções metabólicas (43%), processamento da informação ambiental (28%) e genética (15%) e com processos celulares (13%). Dos mRNAs alvos envolvidos com metabolismo, 43% deles foram associados com o metabolismo energético, 22% com o metabolismo de cofatores e vitaminas, 13% com nucleotídeos, 9% com lipídios e com glicanos e 4% com íons orgânicos (Figura 26B).

Tabela 14. Alvos preditos para Arrc16 no genoma de MIDG2331 por CopraRNA.

p-value	Locus tag	Gene	Posição mRNA		Posição sRNA		Anotação
			Início	Fim	Início	Fim	
0.0000	midg2331_rs01960	<i>glpB</i>	-20	21	77	115	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B
0.0000	midg2331_rs04035	<i>ftsB</i>	73	88	97	112	cell division protein FtsB
0.0000	midg2331_rs01530	<i>cydA</i>	-67	-47	90	111	cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit I
0.0000	midg2331_rs04500	<i>fdxG</i>	-54	0	77	115	sulfate ABC transporter substrate-binding protein
0.0000	midg2331_rs06760	<i>dcuB2</i>	-33	-4	81	106	anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporter
0.0001	midg2331_rs05530	<i>aspA</i>	-31	-4	79	100	aspartate ammonia-lyase
0.0001	midg2331_rs08935	<i>rimO</i>	-29	-6	83	104	30S ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO
0.0001	midg2331_rs01380	<i>apt</i>	74	99	80	105	adenine phosphoribosyltransferase
0.0001	midg2331_rs00520	<i>nrfA</i>	-15	-6	125	134	ammonia-forming cytochrome c nitrite reductase
0.0002	midg2331_rs05345	<i>nrfE</i>	-23	-6	79	96	heme lyase NrfEFG subunit NrfE
0.0002	midg2331_rs08320	<i>frdA</i>	-39	0	77	113	fumarate reductase flavoprotein subunit
0.0004	midg2331_rs00105	<i>ftsQ</i>	-166	-144	78	112	cell division protein FtsQ
0.0005	midg2331_rs00450	N/A	-177	-148	83	112	DUF937 domain-containing protein
0.0007	midg2331_rs02680	N/A	-71	-61	102	112	DUF853 domain-containing protein
0.0007	midg2331_rs04005	<i>sapC</i>	-93	-82	97	108	antimicrobial peptide ABC transporter permease SapC
0.0010	midg2331_rs01285	<i>sodA</i>	-183	-177	125	131	superoxide dismutase [Mn]
0.0013	midg2331_rs00615	N/A	60	85	81	106	RNA chaperone ProQ
0.0014	midg2331_rs07775	<i>mgIA</i>	-10	14	81	109	ABC-type sugar (aldose) transport system, ATPase componen
0.0014	midg2331_rs05280	<i>htpX</i>	-17	2	94	110	protease HtpX
0.0015	midg2331_rs05945	N/A	-122	-94	78	104	hypothetical protein
0.0017	midg2331_rs03650	N/A	-10	2	98	110	hypothetical protein
0.0019	midg2331_rs02320	N/A	-190	-175	97	112	Na ⁺ /H ⁺ antiporter
0.0020	midg2331_rs00350	<i>dppC</i>	-15	-3	98	109	dipeptide ABC transporter permease DppC
0.0022	midg2331_rs00505	<i>ilvD</i>	-11	9	93	110	dihydroxy-acid dehydratase
0.0025	midg2331_rs08790	N/A	11	48	77	113	putative drug resistance protein
0.0026	midg2331_rs00345	<i>dppB</i>	-11	7	88	107	peptide ABC transporter permease
0.0026	midg2331_rs00250	<i>kdsC</i>	24	33	97	106	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase
0.0026	midg2331_rs07825	<i>napA</i>	-78	-67	97	108	periplasmic nitrate reductase NapA
0.0028	midg2331_rs01605	<i>moeA</i>	-199	-186	78	108	Molybdopterin molybdenumtransferase
0.0030	midg2331_rs02035	<i>rseA</i>	-150	-126	82	113	sigma-E factor negative regulatory protein
0.0031	midg2331_rs05215	<i>lsgE</i>	87	99	77	89	putative lipooligosaccharide galactosyltransferase
0.0032	midg2331_rs11040	N/A	-149	-137	102	114	transposase IS200-like protein
0.0032	midg2331_rs02085	<i>relA</i>	54	64	103	113	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase
0.0032	midg2331_rs03530	<i>tabA</i>	-84	-58	80	110	Toxin-antitoxin biofilm protein TabA
0.0035	midg2331_rs00770	<i>nqrA</i>	-99	-92	125	132	NADH:ubiquinone reductase Na ⁺ -transporting subunit A
0.0036	midg2331_rs07715	N/A	-8	3	103	115	Type I restriction-modification system S subunit
0.0036	midg2331_rs03380	<i>glnS</i>	49	70	82	102	glutaminyl-tRNA synthetase
0.0040	midg2331_rs08930	<i>ngt</i>	-107	-83	79	103	Adhesin - putative O-linked N-acetylglucosamintransferase
0.0042	midg2331_rs07810	<i>napB</i>	-13	-6	102	109	nitrate reductase subunit beta
0.0046	midg2331_rs05980	N/A	46	70	76	112	nicotinamide mononucleotide transporter
0.0049	midg2331_rs10885	<i>brnQ</i>	87	99	83	95	branched-chain amino acid permease
0.0050	midg2331_rs03920	<i>lrgA2</i>	-12	0	94	108	putative effector of murein hydrolase LrgA
0.0051	midg2331_rs05940	N/A	56	86	78	105	SAM-dependent methyltransferase
0.0052	midg2331_rs07680	<i>comEA</i>	-22	-13	95	104	DNA uptake protein-binding protein
0.0052	midg2331_rs01110	<i>thrS</i>	-125	-114	101	112	threonyl-tRNA synthetase
0.0052	midg2331_rs01535	<i>cydB</i>	-9	-3	102	108	cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II
0.0053	midg2331_rs10935	N/A	-132	-123	79	88	putative transport protein
0.0053	midg2331_rs07835	<i>napF</i>	-72	-62	101	111	ferredoxin-type protein NapF
0.0054	midg2331_rs09680	<i>rplB</i>	-179	-166	79	92	50S ribosomal protein L2
0.0056	midg2331_rs05730	<i>cytB562</i>	-11	-5	127	133	soluble cytochrome b562
0.0058	midg2331_rs07425	<i>ccmE</i>	-9	0	97	106	cytochrome c-type biogenesis protein
0.0059	midg2331_rs02290	<i>ata_2</i>	-28	-12	81	99	Adhesin Ata autotransporter
0.0069	midg2331_rs02105	<i>fabZ</i>	26	47	81	103	(3R)-hydroxymyristoyl-acyl carrier protein dehydratase
0.0070	midg2331_rs07725	N/A	-9	13	79	108	putative CueR-like transcriptional regulator
0.0071	midg2331_rs06640	N/A	-161	-143	33	51	phospholipid ABC transporter ATP-binding protein MlaF
0.0073	midg2331_rs00410	<i>exbB2</i>	-110	-97	90	103	TonB-system energizer ExbB
0.0076	midg2331_rs08375	<i>tldD</i>	-165	-142	80	106	metalloprotease TldD
0.0076	midg2331_rs08045	<i>rpiA</i>	70	76	126	132	ribose-5-phosphate isomerase
0.0077	midg2331_rs04960	N/A	45	59	89	103	C32 tRNA thiolase
0.0079	midg2331_rs04885	N/A	-195	-137	91	142	large exoprotein involved in heme utilization or adhesion
0.0088	midg2331_rs03440	<i>torY</i>	31	39	100	108	cytochrome c-type protein TorY
0.0092	midg2331_rs00760	<i>nda_1</i>	68	87	79	105	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha subunit 1
0.0093	midg2331_rs10870	<i>hemB</i>	-130	-123	81	88	porphobilinogen synthase
0.0097	midg2331_rs02975	<i>ftsK</i>	-51	-6	81	109	DNA translocase FtsK
0.0099	midg2331_rs07505	<i>ccp</i>	56	62	128	134	cytochrome c peroxidase
0.0100	midg2331_rs06400	N/A	80	90	97	107	short-chain dehydrogenase/reductase
0.0102	midg2331_rs00510	<i>ilvM</i>	-121	-107	92	108	acetolactate synthase 2 small subunit

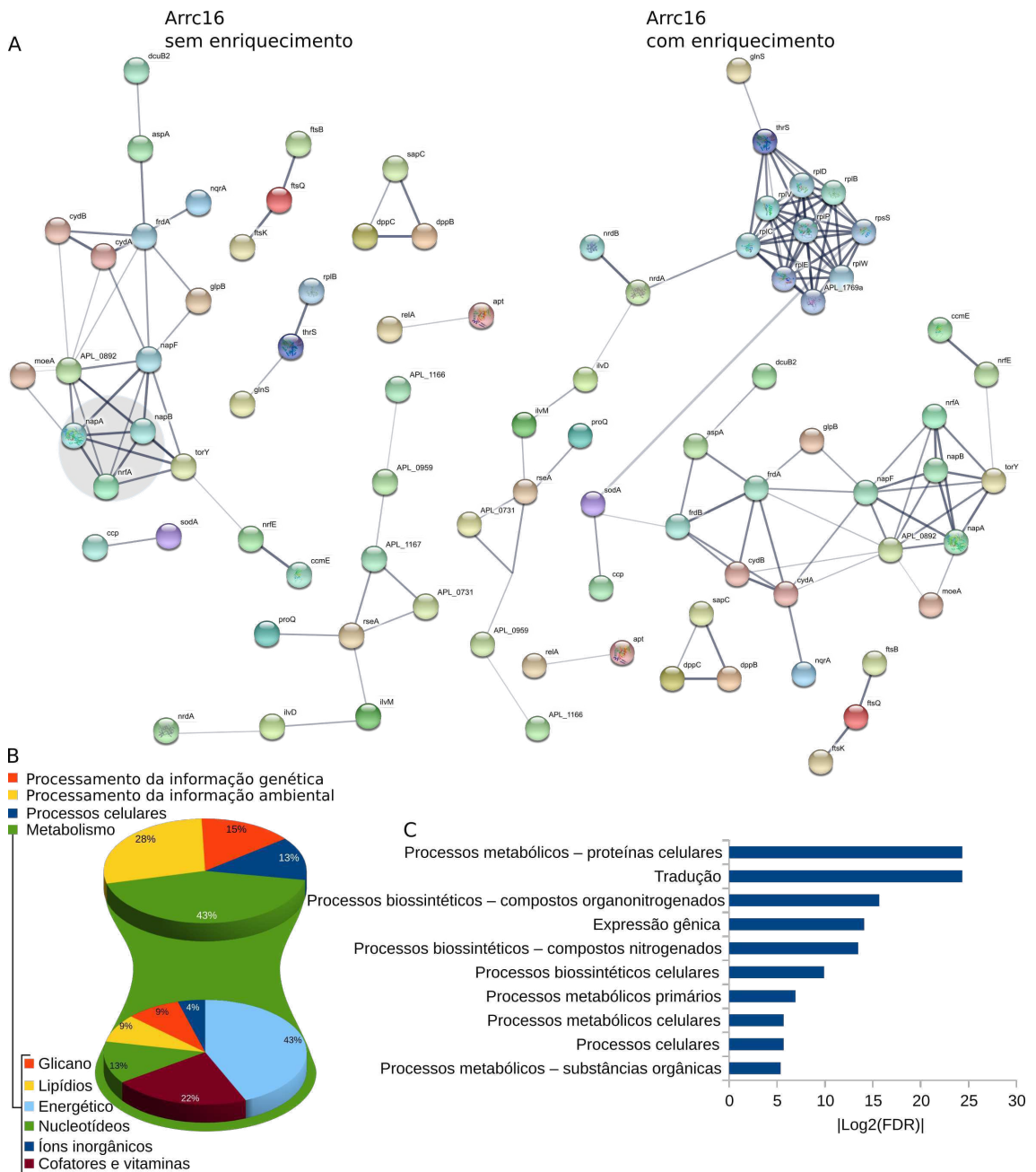


Figura 26. **A** – Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para Arcc16. A sequência de aminoácidos obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos mRNAs foram carregadas no banco de dados STRING e analisadas utilizando as configurações padrões. Nós desconectados foram omitidos da exibição da rede. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. A área sombreada indica genes associados com rota do metabolismo de nitrogênio. **B** – Anotação funcional para mRNAs alvos preditos a partir do banco de dados Kegg. As funções moleculares dos mRNAs foi anotada de acordo com os ortólogos Kegg (KO) para genes e proteínas experimentalmente caracterizadas. A busca foi realizada com base na nomenclatura dos genes anotadas para o genoma de MIDG2331. **C** – Processos biológicos implicados na rede de interação dos mRNAs: o enriquecimento funcional da rede de mRNAs revelou processos biológicos baseados na ontologia dos genes (GO). Todos os processos biológicos foram plotados de acordo com o módulo do log₂ da taxa de falso positivo (FDR).

Tabela 15. Alvos preditos para RNA04 no genoma de MIDG2331 por IntaRNA.

p-value	Locus tag	Gene	Posição mRNA		Posição sRNA		Anotação
			Início	Fim	Início	Fim	
0.0001	midg2331_rs00540	<i>ata_1</i>	0	28	42	70	Adhesin Ata autotransporter
0.0003	midg2331_rs04310	N/A	-19	7	53	80	5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate-homocysteine S-methyltransferase
0.0006	midg2331_rs02090	<i>dxr</i>	-12	19	45	76	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase
0.0008	midg2331_rs10595	<i>tagI</i>	24	40	57	73	DNA-3-methyladenine glycosylase I
0.0009	midg2331_rs02290	<i>ata_2</i>	0	28	42	70	Adhesin Ata autotransporter
0.0020	midg2331_rs04335	<i>mmmC</i>	-174	-133	34	73	bifunctional tRNA
0.0020	midg2331_rs03415	N/A	-19	2	59	81	DUF4747 domain-containing protein
0.0022	midg2331_rs02870	<i>tyrP2</i>	-9	17	56	79	tyrosine transporter
0.0026	midg2331_rs02790	N/A	-13	2	59	75	sugar transporter
0.0032	midg2331_rs02010	N/A	24	61	36	76	sodium:proton symporter
0.0033	midg2331_rs01960	<i>glpB</i>	-13	-3	63	73	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B
0.0042	midg2331_rs00430	<i>dhaL</i>	-14	2	59	76	dihydroxyacetone kinase subunit DhaL
0.0043	midg2331_rs02285	<i>sanA</i>	-9	8	58	74	membrane protein
0.0049	midg2331_rs00505	<i>ilvD</i>	75	88	60	73	dihydroxy-acid dehydratase
0.0051	midg2331_rs00265	<i>grxA</i>	-14	30	34	77	glutaredoxin GrxA family
0.0055	midg2331_rs10130	<i>cysI</i>	-13	2	59	75	NADPH-dependent assimilatory sulfite reductase hemoprotein subunit
0.0056	midg2331_rs04160	<i>cydC</i>	-102	-90	36	48	thiol reductant ABC exporter subunit CydC
0.0058	midg2331_rs01810	N/A	-17	-3	66	79	glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase
0.0066	midg2331_rs06045	N/A	-9	12	58	73	LysR family transcriptional regulator
0.0068	midg2331_rs07355	N/A	-14	-1	60	73	transcriptional regulator
0.0075	midg2331_rs05515	<i>acr3</i>	-4	35	41	81	arsenical-resistance protein
0.0080	midg2331_rs10035	<i>proS</i>	-137	-119	53	71	proline-tRNA ligase
0.0082	midg2331_rs02240	<i>msrB</i>	-10	-1	65	74	peptide-methionine R-S-oxide reductase
0.0090	midg2331_rs04730	<i>bioD</i>	-20	-1	59	79	ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD
0.0090	midg2331_rs08655	<i>cps3B</i>	-5	11	59	75	glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase
0.0094	midg2331_rs09120	<i>rbsC</i>	-165	-154	67	78	ribose ABC transporter permease
0.0097	midg2331_rs09290	<i>sgbE</i>	-12	-4	13	21	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase
0.0098	midg2331_rs05000	<i>tktA</i>	16	52	40	78	transketolase
0.0100	midg2331_rs00665	<i>rnhB</i>	-31	-18	58	72	ribonuclease HII

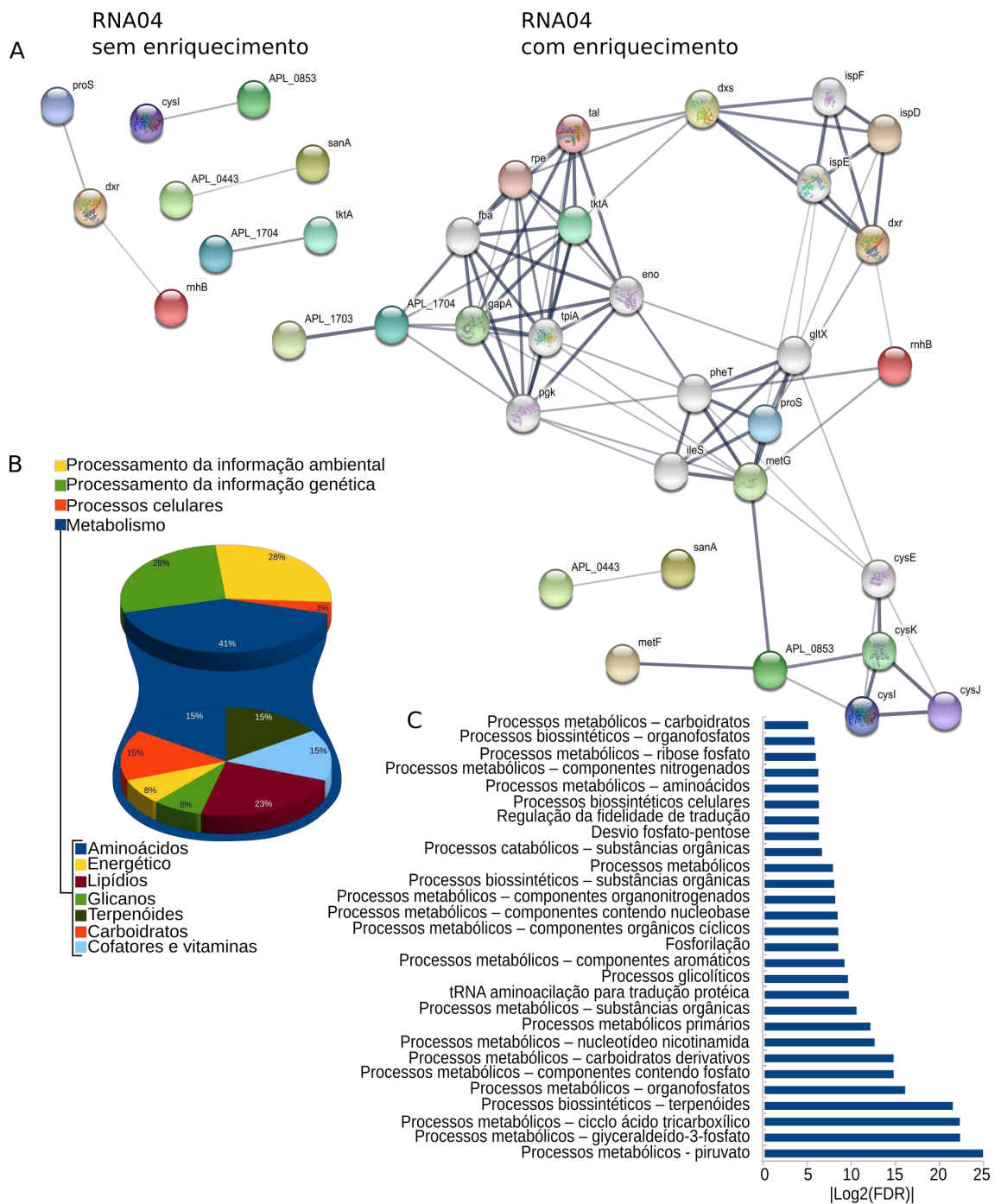


Figura 28. **A** – Interações moleculares entre mRNAs alvos preditos para RNA04. A sequência de aminoácidos obtida a partir da sequência de nucleotídeos dos mRNAs foram carregadas no banco de dados STRING e analisadas utilizando as configurações padrões. Nós desconectados foram omitidos da exibição da rede. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. **B** – Anotação funcional para mRNAs alvos preditos a partir do banco de dados Kegg. As funções moleculares dos mRNAs foi anotada de acordo com os ortólogos Kegg (KO) para genes e proteínas experimentalmente caracterizadas. A busca foi realizada com base na nomenclatura dos genes anotadas para o genoma de MIDG2331. **C** – Processos biológicos implicados na rede de interação dos mRNAs: o enriquecimento funcional da rede de mRNAs revelou processos biológicos baseados na ontologia dos genes (GO). Todos os processos biológicos foram plotados de acordo com o módulo do log₂ da taxa de falso positivo (FDR).

Os sRNAs interagem com regiões específicas dos mRNAs

Com o objetivo de avaliar as regiões dos sRNAs e dos mRNAs que apresentaram maior interação, foram produzidos gráficos de densidade de interação combinando todas as predições com valor de $p\text{-value} \leq 0,01$ para cada sRNA específico (Figuras 29, 30 e 31). As interações obtidas para GcvB (Figura 29A) mostram a presença de duas regiões com alta densidade de interação. A região 1 está localizada entre os nucleotídeos 30 e 60, enquanto que a região 2 abrange os nucleotídeos 100 a 150. Estas regiões correspondem a regiões altamente conservadas entre os homólogos identificados para GcvB, que são observadas entre os nucleotídeos 50 a 80 e 110 a 160. A interação de GcvB com os mRNAs alvos apresentou aumento sutil na região 3'UTR, próximo ao ponto de início da transcrição (Figura 29B).

RNA01 apresentou uma região de interação posicionada entre os nucleotídeos 35 e 55 (Figura 30A), que corresponde à região conservada entre os homólogos posicionada entre os nucleotídeos 50 e 70 do alinhamento apresentado para os homólogos de RNA01 na Figura 17. Assim como GcvB, a interação de RNA01 com os mRNAs alvos também apresentou um aumento sutil na região 3'UTR, próximo ao ponto de início da transcrição (Figura 30B).

Para RNA02, a região conservada identificada entre os homólogos, posicionada entre os nucleotídeos 45 e 60 do alinhamento mostrado na Figura 18 corresponderam à região de maior densidade de interações entre RNA02 e seus mRNAs alvos, que está demonstrada na Figura 31A entre os nucleotídeos 37 e 52. A interação com os mRNAs alvos mostra uma tendência com a região próxima ao início da transcrição (Figura 31B).

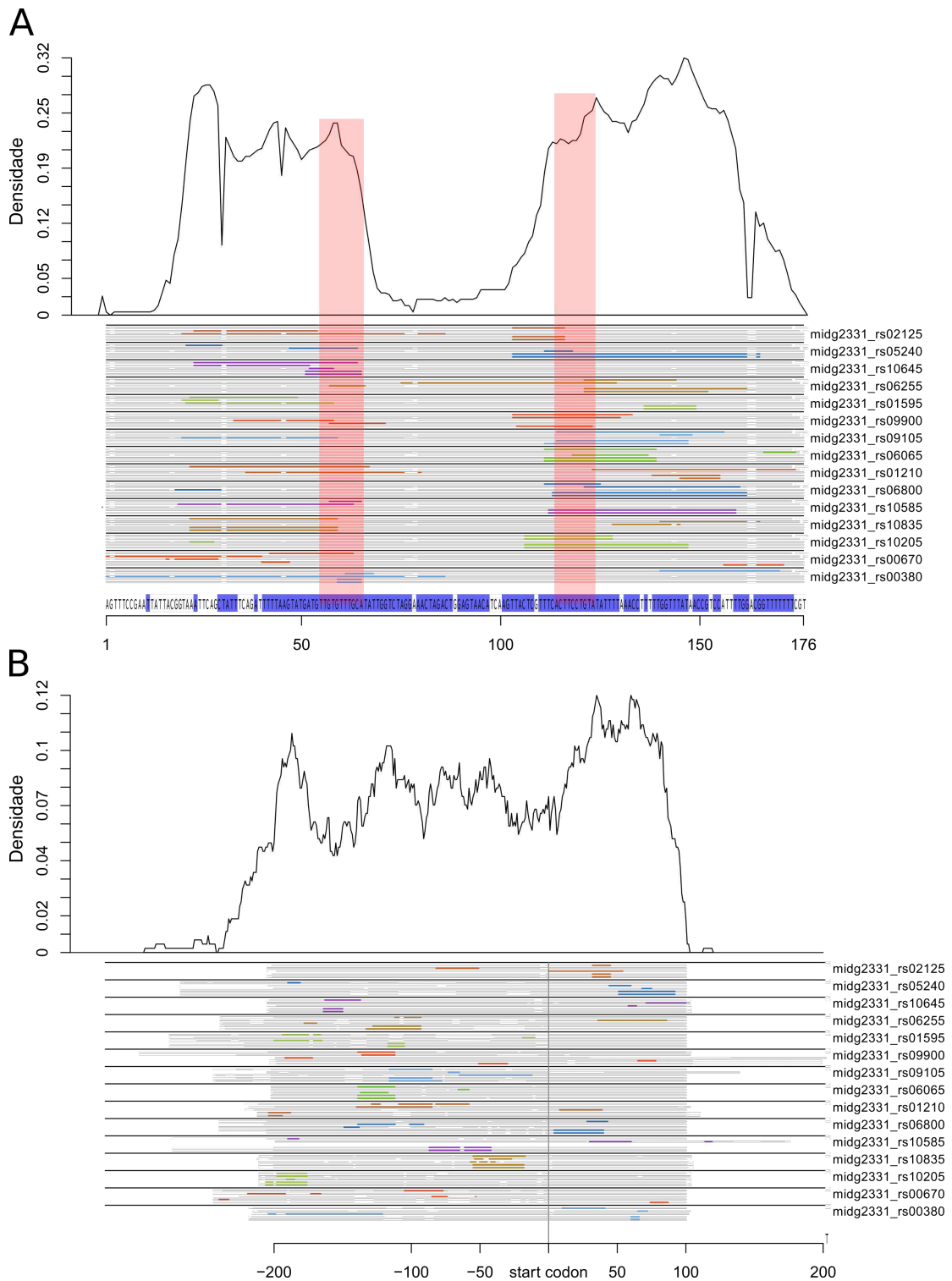


Figura 29. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para GcvB (A) e seus mRNAs alvos (B). Os gráficos de densidade fornecem a frequência relativa da posição da interação específica predita para os sRNAs e seus mRNAs alvos. Os gráficos combinam todas as predições com um valor de $P \leq 0,01$ em todos os homólogos incluídos na predição. Os picos máximos obtidos, quando presentes, indicam domínios de interação distintos. O alinhamento esquemático dos sRNAs homólogos, indicado na parte inferior de cada gráfico, mostra os domínios de interação preditos do homólogo com o alvo. As regiões alinhadas são exibidas em cinza, intervalos em branco e regiões de interação preditas em cores (as diferenças de cor são apenas para contraste). Estão representados os quinze alvos que apresentaram a melhor combinação de p -value com interação presente nos picos máximos, quando evidentes. A sequência de GcvB está representada no final do gráfico A, com as regiões de conservação ($\geq 80\%$) dos homólogos anotadas em azul. As regiões sombreadas de rosa em A indicam a região *seed* identificada para GcvB.

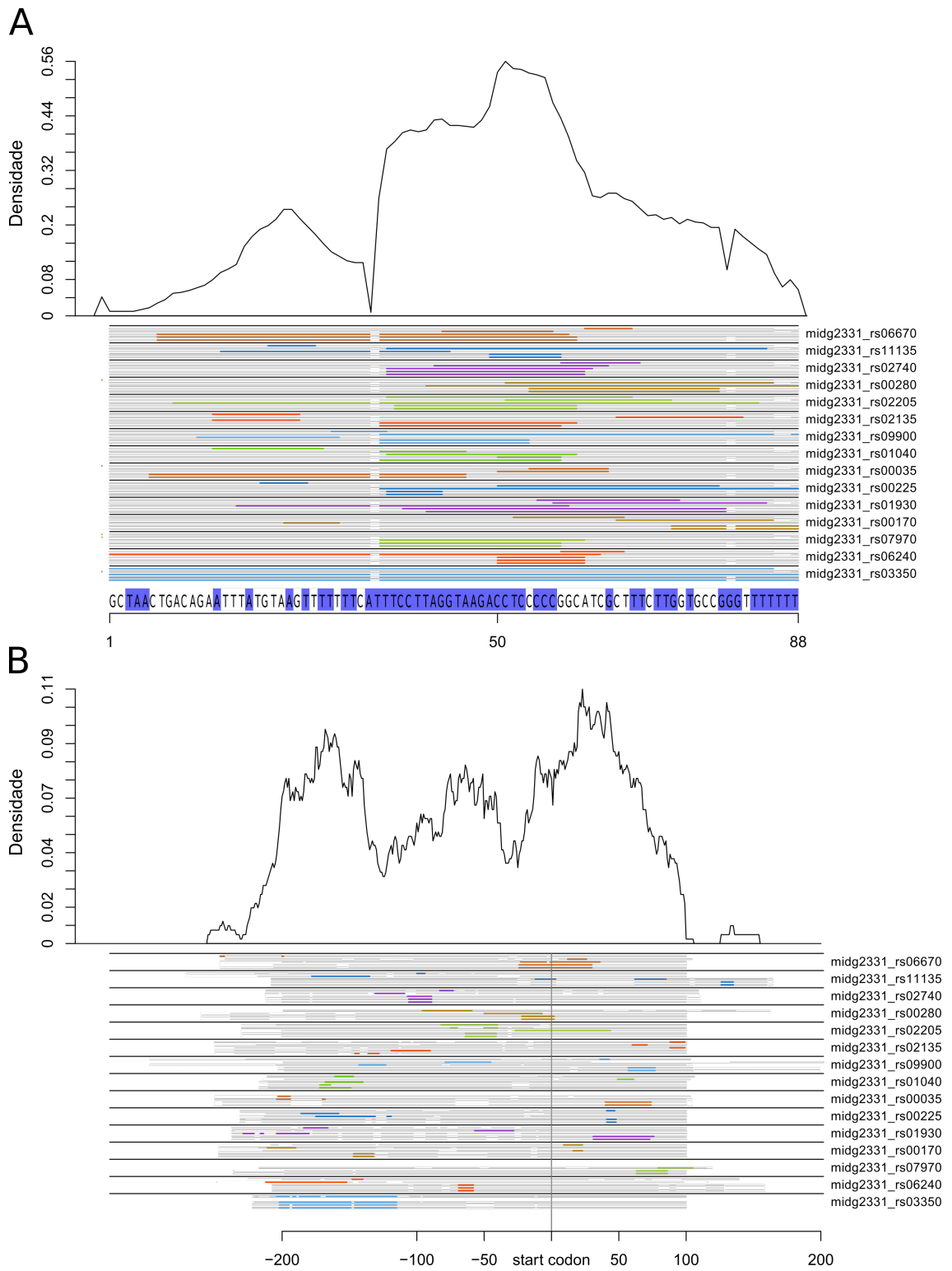


Figura 30. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para RNA01 (A) e seus mRNAs alvos (B). Os gráficos de densidade fornecem a frequência relativa da posição da interação específica predita para os sRNAs e seus mRNAs alvos. Os gráficos combinam todas as predições com um valor de $P \leq 0,01$ em todos os homólogos incluídos na predição. Os picos máximos obtidos, quando presentes, indicam domínios de interação distintos. O alinhamento esquemático dos sRNAs homólogos, indicado na parte inferior de cada gráfico, mostra os domínios de interação preditos do homólogo com o alvo. As regiões alinhadas são exibidas em cinza, intervalos em branco e regiões de interação preditas em cores (as diferenças de cor são apenas para contraste). Estão representados os quinze alvos que apresentaram a melhor combinação de *p-value* com interação presente nos picos máximos, quando evidentes. A sequência de RNA01 está representada no final do gráfico A, com as regiões de conservação ($\geq 80\%$) dos homólogos anotadas em azul.

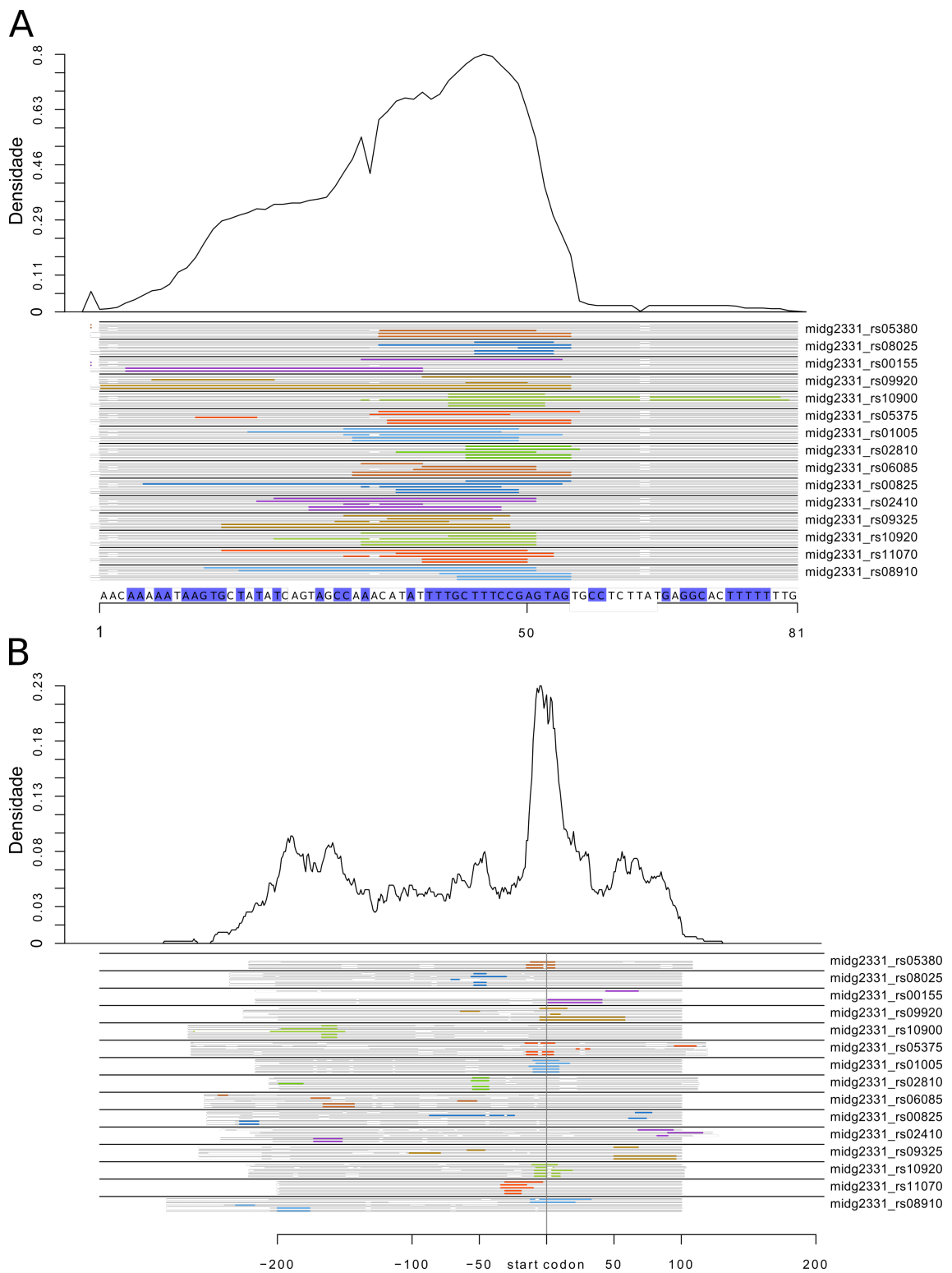


Figura 31. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para RNA02 (A) e seus mRNAs alvos (B). Os gráficos de densidade fornecem a frequência relativa da posição da interação específica predita para os sRNAs e seus mRNAs alvos. Os gráficos combinam todas as predições com um valor de $P \leq 0,01$ em todos os homólogos incluídos na predição. Os picos máximos obtidos, quando presentes, indicam domínios de interação distintos. O alinhamento esquemático dos sRNAs homólogos, indicado na parte inferior de cada gráfico, mostra os domínios de interação preditos do homólogo com o alvo. As regiões alinhadas são exibidas em cinza, intervalos em branco e regiões de interação preditas em cores (as diferenças de cor são apenas para contraste). Estão representados os quinze alvos que apresentaram a melhor combinação de p -value com interação presente nos picos máximos, quando evidentes. A sequência de RNA02 está representada no final do gráfico A, com as regiões de conservação ($\geq 80\%$) dos homólogos anotadas em azul.

Arrc14 apresentou uma clara e intensa região de interação entre os nucleotídeos 140 e 150 (Figura 32A), que corresponde à região conservada posicionada entre os nucleotídeos 140 e 150 do alinhamento entre homólogos apresentado na Figura 19. Assim como os sRNAs anteriormente descritos, Arrc14 apresenta uma interação com os mRNAs alvos próximos à região do início da transcrição (Figura 32B).

Arrc16 e RNA04 foram os sRNAs que apresentaram maior homogeneidade na interação sRNA-mRNA alvo. Arrc16 mostrou forte densidade de interação na região compreendida entre os nucleotídeos 85 e 115 (Figura 33A), que correspondem aos nucleotídeos posicionados na região conservada anotada entre os nucleotídeos 105 e 135 do alinhamento apresentado na Figura 20. A interação com os mRNAs alvos mostra associação evidente com a região próxima ao início da transcrição (Figura 33B).

RNA04 apresentou densidade de interação intensa entre os nucleotídeos 60 e 80 e uma clara interação com os mRNAs alvos na região de início da transcrição (Figura 34). Estas regiões não foram avaliadas como regiões conservadas uma vez que RNA04 não apresentou homólogos.

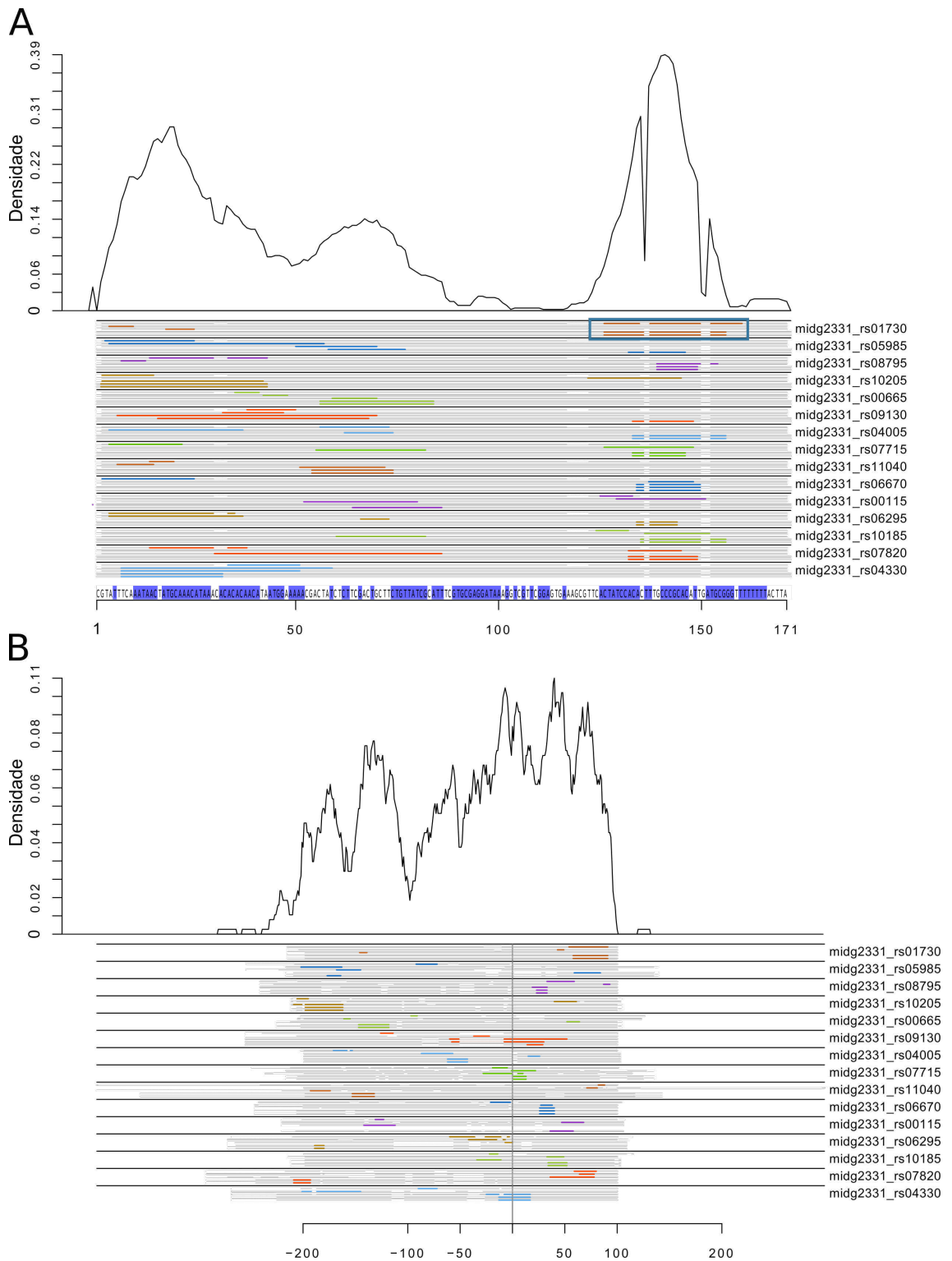


Figura 32. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para Arrc14 (A) e seus mRNAs alvos (B). Os gráficos de densidade fornecem a frequência relativa da posição da interação específica predita para os sRNAs e seus mRNAs alvos. Os gráficos combinam todas as predições com um valor de $P \leq 0,01$ em todos os homólogos incluídos na predição. Os picos máximos obtidos, quando presentes, indicam domínios de interação distintos. O alinhamento esquemático dos sRNAs homólogos, indicado na parte inferior de cada gráfico, mostra os domínios de interação preditos do homólogo com o alvo. As regiões alinhadas são exibidas em cinza, intervalos em branco e regiões de interação preditas em cores (as diferenças de cor são apenas para contraste). Estão representados os quinze alvos que apresentaram a melhor combinação de *p-value* com interação presente nos picos máximos, quando evidentes. A sequência de Arrc14 está representada no final do gráfico A, com as regiões de conservação ($\geq 80\%$) dos homólogos anotadas em azul. O retângulo azul em A indica a interação do gene MIDG2331_RS01730.

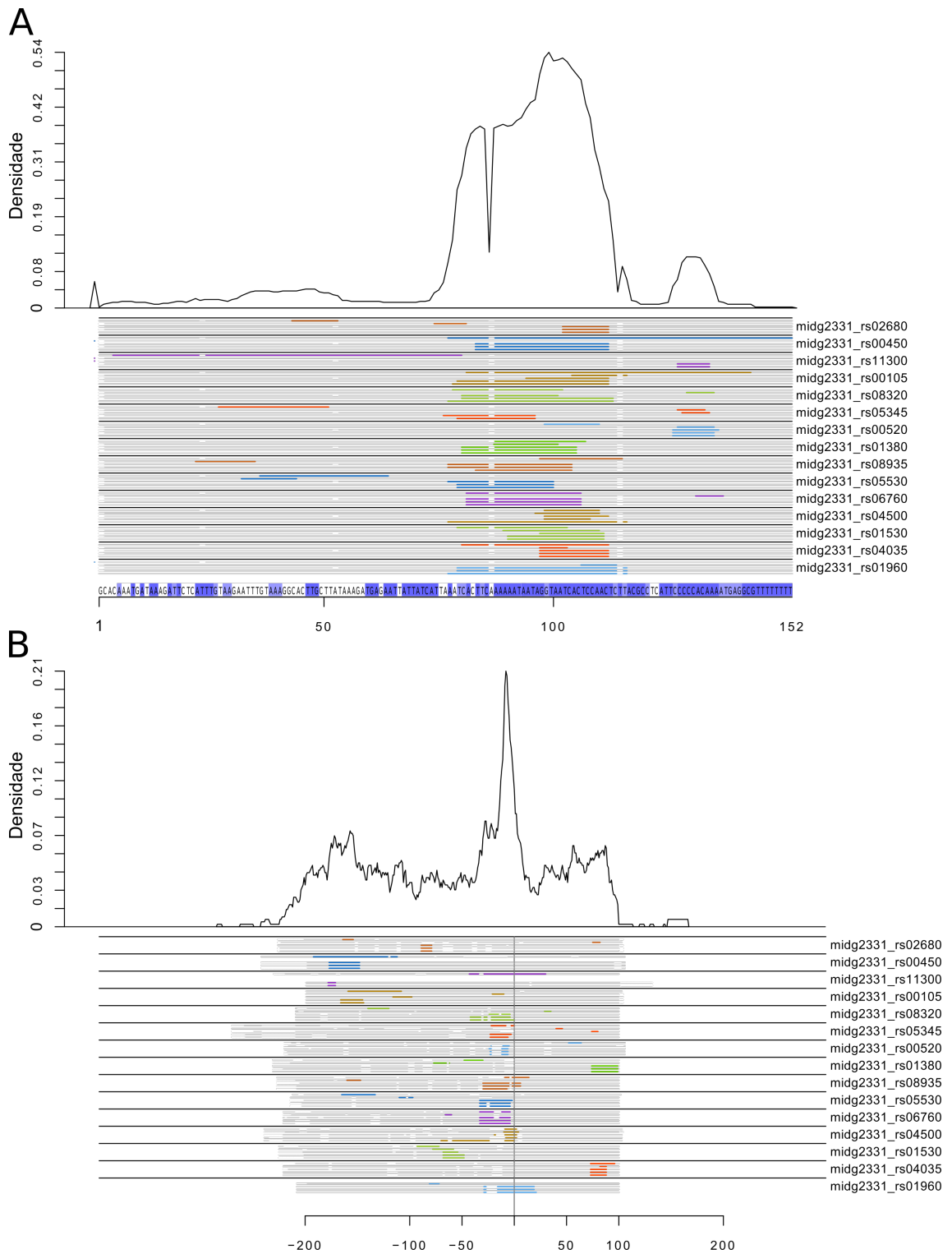


Figura 33. Visualização dos domínios de interação preditos por CopraRNA para Arrc16 (A) e seus mRNAs alvos (B). Os gráficos de densidade fornecem a frequência relativa da posição da interação específica predita para os sRNAs e seus mRNAs alvos. Os gráficos combinam todas as predições com um valor de $P \leq 0,01$ em todos os homólogos incluídos na predição. Os picos máximos obtidos, quando presentes, indicam domínios de interação distintos. O alinhamento esquemático dos sRNAs homólogos, indicado na parte inferior de cada gráfico, mostra os domínios de interação preditos do homólogo com o alvo. As regiões alinhadas são exibidas em cinza, intervalos em branco e regiões de interação preditas em cores (as diferenças de cor são apenas para contraste). Estão representados os quinze alvos que apresentaram a melhor combinação de *p-value* com interação presente nos picos máximos, quando evidentes. A sequência de Arrc16 está representada no final do gráfico A, com as regiões de conservação ($\geq 80\%$) dos homólogos anotadas em azul.

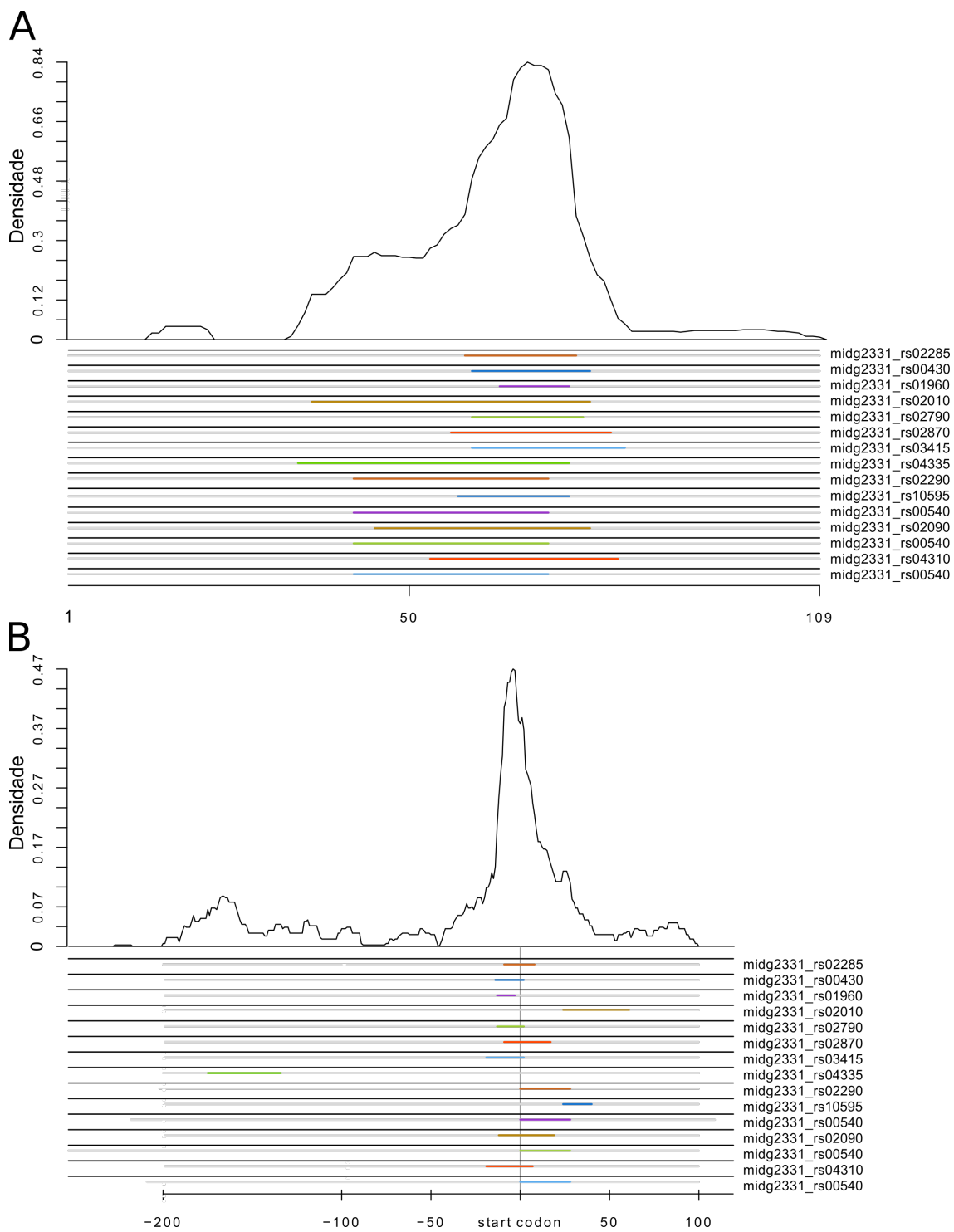


Figura 34. Visualização dos domínios de interação preditos por IntaRNA para RNA04 e seus mRNAs alvos. Os gráficos de densidade fornecem a frequência relativa da posição da interação específica predita para os sRNAs e seus mRNAs alvos. Os gráficos combinam todas as predições com um valor de $P \leq 0,01$. Os picos máximos obtidos indicam domínios de interação distintos. O esquema abaixo do gráfico indica os domínios de interação para os quinze alvos que apresentaram a melhor combinação de *p-value*. As regiões de interação são apresentadas em cores apenas para contraste.

Arrc14 interage com o metabolismo de amino e nucleotídeos açúcares

Para avaliar se mRNAs alvos preditos estavam relacionados com o fenótipo obtido para mutantes sRNAs descrito no capítulo 2, foi selecionado o mRNA MIDG2331_RS01730 (Tabela 13), predito como alvo para Arrc14. MIDG2331_RS01730 foi o alvo que apresentou melhor combinação de *p-value* e região de interação entre os alvos preditos para este sRNA (Figura 32A). Em *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20, MIDG2331_RS01730 está anotado como APL_0334 e as interações obtidas para este gene ainda são limitadas. Assim, foi obtido o enriquecimento funcional a partir do homólogo do gene MIDG2331_RS01730 em *Escherichia coli* K12, denominado de rapZ. A identidade de MIDG2331_RS01730 em relação a APL_0334 e rapZ são mostradas na Figura 35.

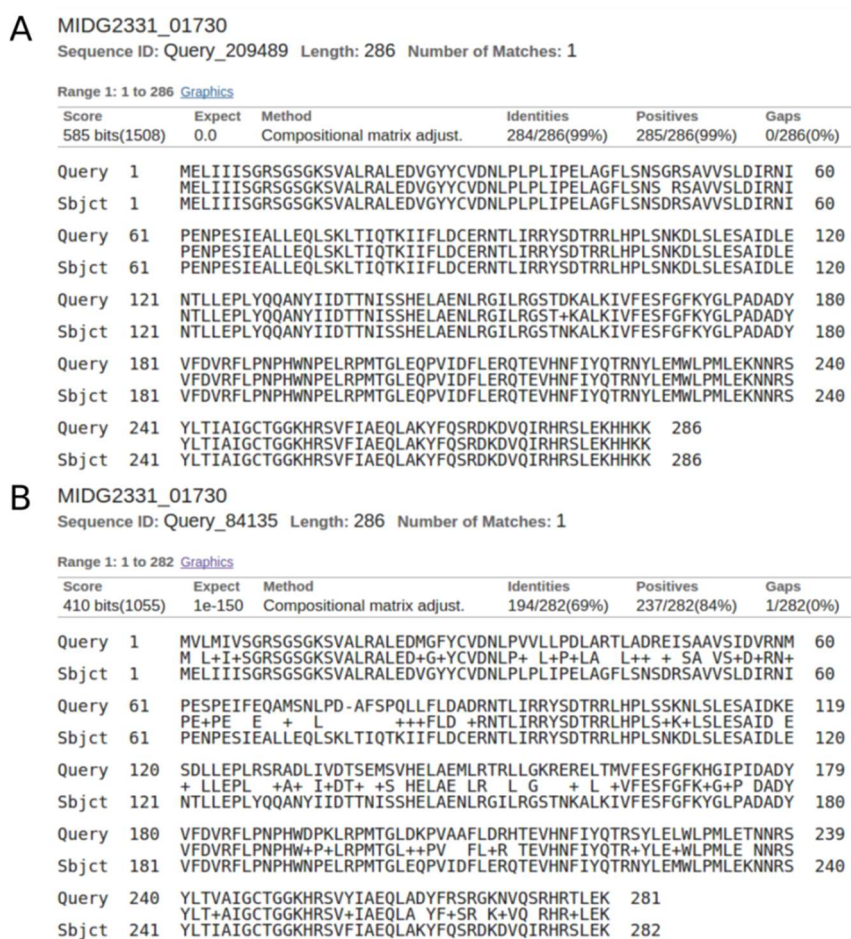


Figura 35. BLASTp de MIDG2331_RS01730 contra APL_0334 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (A) e RapZ de *Escherichia coli* K12 (B).

A rede de enriquecimento realizada a partir de rapZ em *Escherichia coli* K12 evidenciou forte interação de rapZ com o gene glmS, envolvido no metabolismo de aminoácúcares e na biossíntese de UDP-N-acetilglucosamina (Figura 36). A rota metabólica para amino e nucleotídeo açúcares (ID Kegg pathway: 00520) foi avaliada quanto à presença em *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 e está ilustrada na Figura 37.

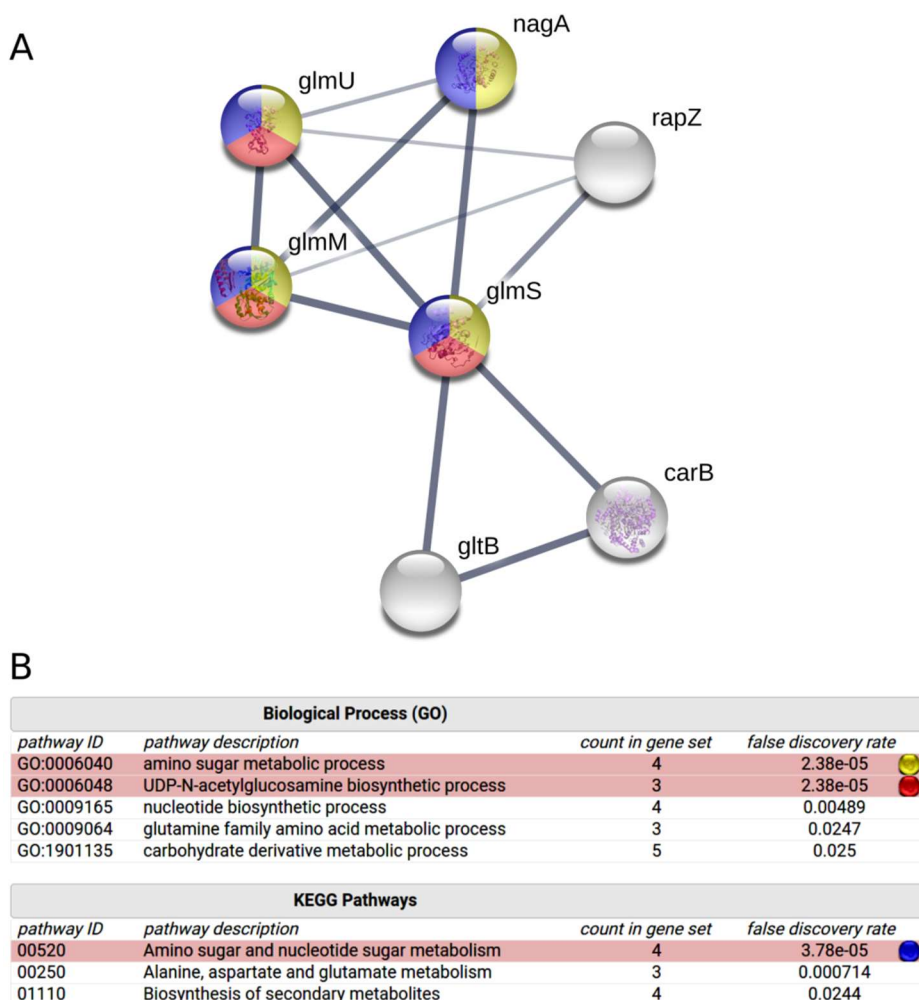


Figura 36. **A** – Rede de interação obtida para a proteína RapZ, utilizando dados descritos para *Escherichia coli* K12. A sequência de aminoácidos de RapZ foi carregada no banco de dados STRING e analisada utilizando as configurações padrões. As interações entre os nós da rede denotam o nível de confiança, onde a espessura da linha indica a força do suporte aos dados. **B** – O enriquecimento funcional de RapZ revelou processos biológicos e rotas metabólicas envolvidas no metabolismo e biossíntese de amino açúcares. As cores indicam o processo ou rotas metabólicas associadas com os genes enriquecidos.

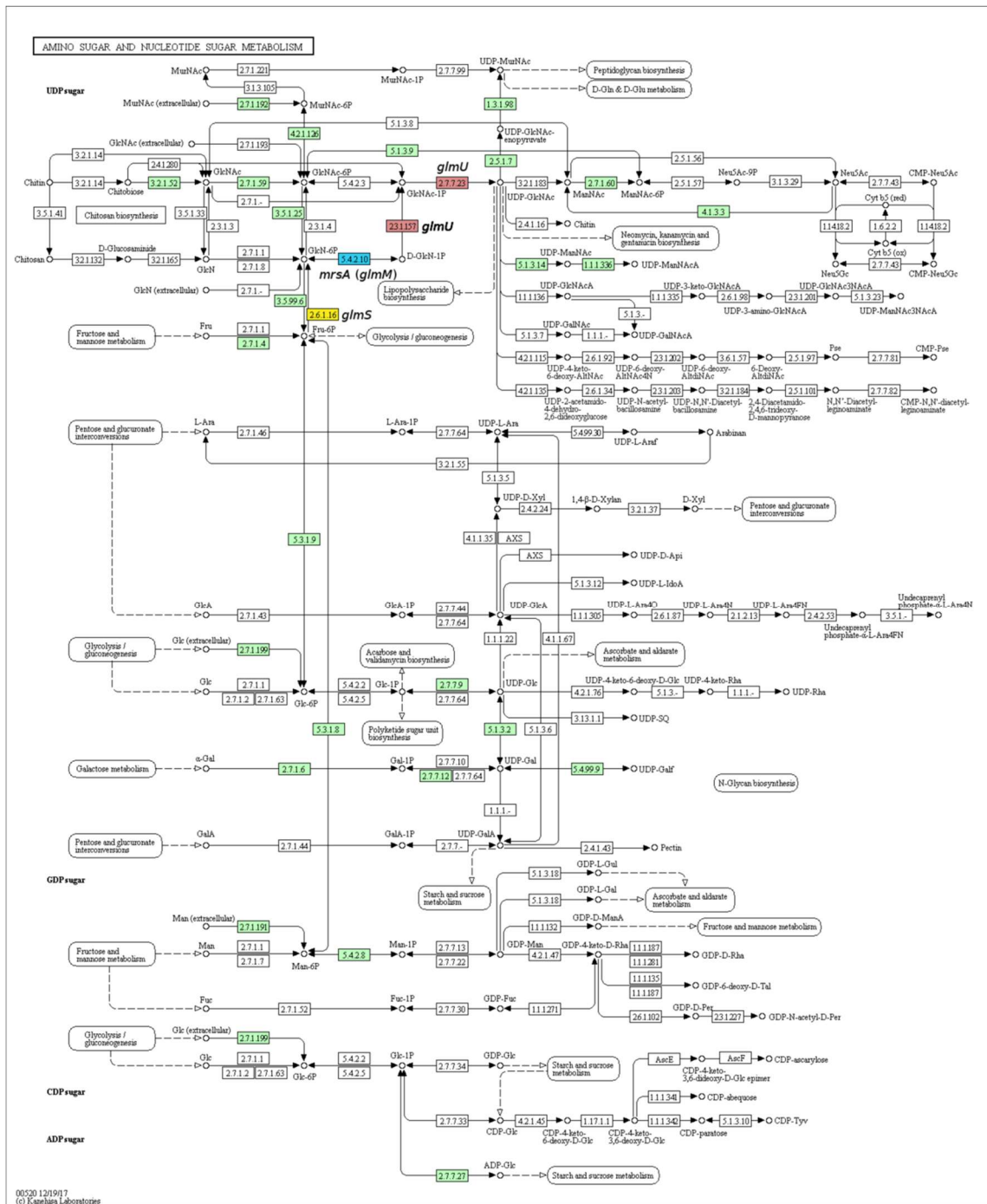


Figura 37. Rota metabólica de aminoácidos e nucleotídeos em *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20. O mapa foi gerado pelo banco de dados Kegg pathway e está disponível em https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=apl&mapno=00520&mapscal_e=&show_description=hide. Os pontos de ação dos genes *glmS*, *glmU* e *mrsA* (*glmM*) estão indicados em caixas amarela, vermelha e azul, respectivamente.

A interação de Arrr14 com MIDG2331_RS01730 (região *seed*) ocorre entre os nucleotídeos 126 e 153 de Arrr14 e entre 82 e 92 de MIDG2331_RS01730 (Figura 38). A região de reconhecimento em Arrr14 corresponde a uma região conservada, identificada a partir do alinhamento entre seus homólogos (Figura 19). Em MIDG2331_RS01730, a região de reconhecimento encontra-se adjacente a uma sequência de reconhecimento da endonuclease Rnase E.

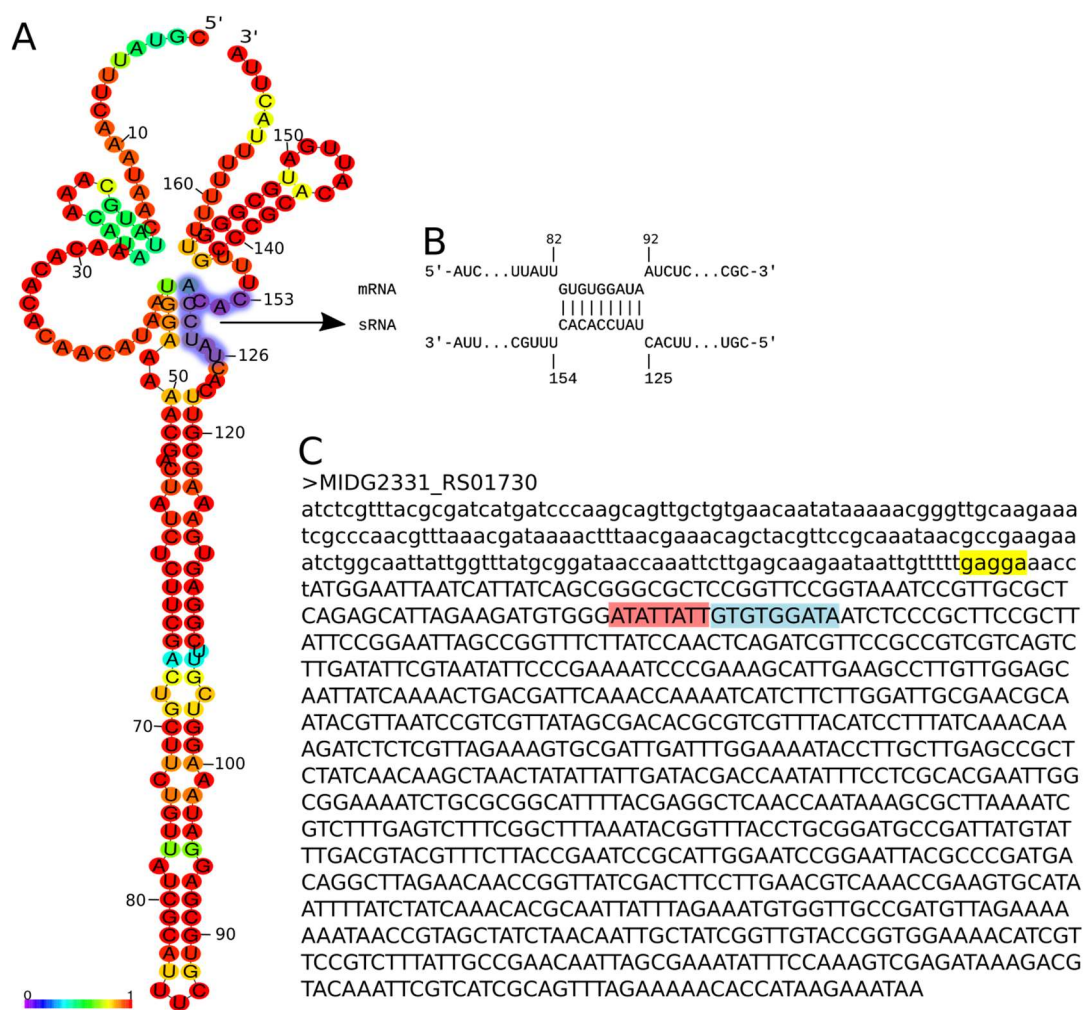


Figura 38. Interação entre Arrr14 e MIDG2331_RS01730. **A** – Estrutura de Arrr14 predita por RNAfold. A sequência *seed* de reconhecimento, compreendida entre os nucleotídeos 126 e 153, está indicada na região sombreada em azul. A barra de cor indica a probabilidade de pareamento. **B** – Alinhamento entre Arrr14 e MIDG2331_RS01730, obtido por CopraRNA. **C** – Sequência de MIDG2331_RS01730 (letras maiúsculas) e sequência de 200 nucleotídeos downstream ao gene (letras minúsculas). A região de reconhecimento de Arrr14 está anotada com fundo azul. A região adjacente, anotada com sombreado vermelho, corresponde à sequência de reconhecimento da endonuclease Rnase E. A região de Shine Dalgarno, posicionada - 10 em relação ao codon de iniciação ATG está anotado com sombreado amarelo.

DISCUSSÃO

Características fenotípicas de App DsRNAs

Neste estudo, foram investigados os papéis de sRNAs de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331 sorotipo 8 em fenótipos relacionados com a colonização, adesão e virulência da bactéria. Para se obter as informações referentes ao papel dos sRNAs GcvB, RNA01, RNA02, RNA04, Arrc14 e Arrc16, linhagens mutantes foram obtidas por recombinação homóloga utilizando cassetes de DNA de inativação a partir das linhagens parentais selvagem MIDG2331 WT e da sua linhagem isogênica MIDG2331 Δhfq , com deleção para o gene *hfq*. Consideramos que os dados aqui apresentados mostraram, pela primeira vez, forte associação de sRNAs com a virulência de App, assim como já evidenciado para diferentes bactérias patogênicas de humanos e animais. O sRNA SgrS, por exemplo, já foi demonstrado estar envolvido na expressão do efector de virulência específico de *Salmonella* (SopD) (PAPENFORT; VOGEL, 2014). O sRNA RNAIII, encontrado em diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, regula diversos mRNAs envolvidos com a patogênese de *Staphylococcus aureus* (MICHAUX et al., 2014). Outro sRNA também envolvido com a virulência é rliB, que já foi demonstrado que regula a colonização de órgãos internos de camundongos por *Listeria monocytogenes*. Para a família Pasteurellaceae, alguns sRNAs já foram identificados e associados à virulência. Por exemplo, HrrF foi o primeiro sRNA a ser identificado para o gênero *Haemophilus*, na regulação de ferro da bactéria patogênica para humanos *H. influenzae* (SANTANA et al., 2014). Homólogos de Hrrf já foram encontrados em outras Pasteurellaceas, como em *Pasteurella multocida* (SANTANA et al., 2014), um patógeno enzoótico, e em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AMARASINGHE et al., 2012), um patógeno humano associado com periodontite, endocardite e abscessos cerebrais (ÅBERG; KELK;

JOHANSSON, 2015). O bem conservado sRNA GcvB também é um exemplo de sRNA envolvido com a virulência (GULLIVER et al., 2018), através do metabolismo de aminoácidos, que já foi descrito em Pasteurellaceae, incluindo em *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ROSSI et al., 2016). Apesar destes exemplos, sRNAs envolvidos nos mecanismos de regulação da virulência em Pasteurellaceae ainda são pouco conhecidos.

A máxima velocidade específica de crescimento (μ_{\max}) é uma medida que avalia a velocidade de crescimento bacteriano em condições onde a disponibilidade de substrato se encontra em excesso e os fatores ambientais são adequados e invariáveis entre as linhagens avaliadas (PERNI; ANDREW; SHAMA, 2005). Uma das vantagens dos sRNAs na regulação da expressão gênica, em relação aos mecanismos proteicos de regulação, é a velocidade de resposta obtida para alterações ambientais. Assim, espera-se a participação de sRNAs em condições onde os fatores ambientais não sejam totalmente adequados à homeostase da bactéria. App é uma bactéria fastidiosa e o meio BHI acrescido de NAD é um meio rico que fornece todos os requerimentos necessários para o seu desenvolvimento. Portanto, não era esperado que ocorressem alterações na μ_{\max} das linhagens analisadas, exceto se algum dos sRNAs testados estivessem envolvidos com o metabolismo primário da bactéria. Dentre os sRNAs testados, já existem informações para o papel de GcvB no metabolismo de aminoácidos. GcvB é um sRNA dependente de Hfq amplamente distribuído em bactérias Gram-negativas (PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2009), incluindo *A. pleuropneumoniae* (ROSSI et al. 2016) e *Pasteurella multocida* (MÉGROZ et al., 2016), que regula a tradução de proteínas envolvidas na biossíntese e transporte de aminoácidos (PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2008). Em *E. coli* e em *Salmonella Typhimurium* a expressão de GcvB é induzida quando o meio é rico em nutrientes, especialmente glicina. Assim, durante períodos de diminuição de glicina ocorre

decréscimo na produção de GcvB, o que resulta na ativação da biossíntese de aminoácidos e de proteínas de transporte de aminoácidos, que seriam normalmente reprimidas pelo sRNA GcvB (URBANOWSKI; STAUFFER; STAUFFER, 2000). A análise do crescimento de mutantes GcvB em *E. coli* e em *S. Typhimurium* demonstrou que a ausência deste sRNA diminui a velocidade de crescimento, quando comparado com o seu parental selvagem (ARGAMAN et al., 2001; SHARMA et al., 2007). Por outro lado, análises em *Pasteurella mutocida*, uma Pasteurelanceae, demonstraram que mutantes GcvB não apresentam diferença na velocidade de crescimento quando comparados com a linhagem selvagem (GULLIVER et al., 2018). Este resultado corrobora com os valores de μ_{\max} por nós obtidos para as linhagens selvagem e WT_ΔgcvB, na qual a máxima velocidade específica de crescimento não diferiu entre as linhagens mutantes e parentais. As linhagens WT_Δrna01, Δhfq_Δrna01 e WT_Δarrc14 apresentaram diminuição nos valores de μ_{\max} . Coincidentemente, os alvos identificados para RNA01 (Tabela 11) e Arrc14 (Tabela 13), assim como suas anotações e enriquecimentos funcionais (Figuras 23 e 25), evidenciaram interação com as vias metabólicas primárias. A diminuição de μ_{\max} na linhagem WT_Δarrc14 foi acompanhada de queda na população total e no crescimento máximo obtido, os quais também são explicados pela ação dos mRNAs alvos elucidados para Arrc14.

Neste estudo foi demonstrado que sRNAs são importantes no processo de adesão em superfícies bióticas e abióticas por App. A adesão das bactérias é condição *sine qua non* para o estabelecimento da doença e pode contribuir com o tropismo do tecido colonizado (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). A aderência é desempenhada por proteínas que podem ser categorizadas em (i) autotransportadores, (ii) associadas a fimbrias ou (iii) proteínas de membrana externa (BUJOLD; MACINNES, 2015), as quais permitem, além da interação patógeno-hospedeiro, a aderência a superfícies

abióticas, autoagregação com outras bactérias e a participação nos estágios iniciais da formação de biofilme (KLEMM; SCHEMBRI, 2000).

Diversos trabalhos têm mostrado o envolvimento de sRNAs no processo de adesão e formação inicial de biofilme. Os sRNAs OmrA/B (HOLMQVIST et al., 2010), McaS (JORGENSEN et al., 2012; THOMASON et al., 2012), RprA (VANDERPOOL; BOBROVSKYY; RICHARDS, 2015), VrrA (SONG et al., 2014) e GcvB (JORGENSEN et al., 2012) atuam em uma complexa rede de regulação que envolve o sistema de dois componentes CsgD/CsgR, regulando a formação de biofilme. A ação dos sRNAs supracitados é dependente da atuação da proteína Hfq. Em *App*, já está estabelecido que a chaperona de RNA Hfq promove diminuição na aderência e formação de biofilmes (CRISPIM, 2014; SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013), o que corrobora com nossos dados, onde todas as linhagens mutantes derivadas do parental isogênico Δhfq apresentaram diminuição da adesão em superfície biótica e quatro linhagens apresentaram atenuação da adesão em superfície abiótica.

ZHOU et al. (2013) demonstraram em *App* que a adesão em linhagens de células SJPL (epitélio alveolar de macacos verdes) e PIEC (endotélio arterial de suínos) é dependente de fímbrias do tipo IV (gene *apfA*) e linhagens de *App* $\Delta apfA$ diminuem a colonização no tecido pulmonar de camundongos. CUCCUI et al. (2017) mostraram que a glicosilação de adesinas do tipo autotransportador (gene *ataC*) é necessária para a adesão de *App* em células A549 (epitélio alveolar basal de adenocarcinoma humano – ATCC, CCL1-85, US) e linhagens mutantes para este gene são atenuadas no modelo alternativo de *G. mellonella*. O terceiro tipo de adesinas, as proteínas de membrana externa (OMPs), são descritas como proteínas multifuncionais capazes de formarem poros na membrana externa de Gram-negativas (BUJOLD; MACINNES, 2015) e contribuem, entre outras funções, para o processo de adesão.

A regulação de adesinas (fimbrias tipo I) por sRNAs foi descrito em *Escherichia coli* por BAK et al. (2015) em um estudo onde se relacionou a motilidade, formação de biofilme e de fimbrias tipo I. Os autores identificaram trinta e três sRNAs que afetam estes processos biológicos, sendo que cinco sRNAs que inibiram a formação de fimbrias também diminuíram a formação de biofilmes. A análise realizada pelos autores para verificação de biofilme foi similar àquela utilizada neste trabalho para determinação de adesão em superfície abiótica.

App é capaz de suportar os agentes estressores presentes no interior do hospedeiro e esta capacidade para se ajustar e sobreviver em um ambiente que sofre alterações bruscas contribui para a sua virulência (BALTES; BUETTNER; GERLACH, 2007). Para estudar o papel funcional dos sRNAs no processo de virulência, nós selecionamos condições que podem ser relevantes no trato respiratório ou durante o processo infeccioso. Assim, as linhagens parentais e mutantes foram cultivadas em condições de estresse osmótico (KCL), oxidativo (H₂O₂), disponibilidade de oxigênio (aerobiose/anaerobiose) e temperatura (37 / 42 °C). Não foi observado alterações no crescimento das linhagens, mutantes ou parentais, quando submetidas ao crescimento em condições de anaerobiose e em ambiente com 5% de CO₂. Para a análise de estresse térmico, nenhuma das linhagens (parentais ou mutantes) se desenvolveram em caldo BHI-NAD quando incubadas a 42 °C. Diversos pesquisadores têm mostrado que a adaptação de App às condições do hospedeiro é mediada por fatores associados ao processo de infecção durante o crescimento *in vivo* (BOSSÉ et al., 2002; CHIERS et al., 2010; LI et al., 2014). Por exemplo, as chaperonas térmicas HPS70 (MIDG2331_02134 - *dnaK*) HSP40 (MIDG2331_02134 - *dnaJ*) e o sensor de estresse periplasmático *degS* (MIDG2331_00759) foram descritas como proteínas constitutivas altamente expressas durante a infecção em suínos (KLITGAARD et al., 2012). Segundo os autores, estas proteínas podem ser importantes para a sobrevivência da bactéria no interior dos macrófagos durante o processo de infecção.

As linhagens Δhfq $\Delta sRNAs$, exceto Δhfq $\Delta arrc14$, apresentaram diminuição na resistência aos agentes estressores osmótico e oxidativo. Esta diminuição está de acordo com os dados obtidos nas pesquisas feitas por SUBASHCHANDRABOSE et al. (2013), que obtiveram resultado semelhante para outras linhagens de App e mostraram que Hfq possui efeito pleiotrópico frente a condições de estresse, processo de adesão e virulência. CRISPIM (2014) também obteve resultados semelhantes ao nosso para a linhagem App MIDG2331 e seu mutante isogênico Δhfq . O papel de Hfq como regulador global e seu papel fundamental na virulência e na formação da cápsula também foi recentemente descrito para *Pasteurella multocida* (MÉGROZ et al., 2016).

A linhagem WT $\Delta arrc14$ apresentou maior resistência às condições de estresse osmótico do que seu parental MIDG2331 WT. Conforme citado anteriormente, esta linhagem também apresentou maior adesão tanto em superfície abiótica quanto biótica. A relação entre aumento da adesão, formação de biofilme e maior resistência a agentes estressores já foi descrita por diversos pesquisadores e, comparado às células planquitônicas, as bactérias no interior da matriz de biofilme são mais resistentes às condições de estresse osmótico, oxidativo, ácido, à exposição de antibióticos e à ação do sistema imune (CHAMBERS; SAUER, 2013; KLITGAARD et al., 2012; PÉREZ-REYTOR et al., 2017; SONG et al., 2014). Assim, propõe-se que o aumento na resistência ao estresse osmótico observado para a linhagem WT $\Delta arrc14$ esteja relacionado com o aumento da sua capacidade de adesão e, conseqüentemente, formação de biofilme. Por outro lado, não foi observado nenhuma alteração para as linhagens mutantes ou parentais frente ao estresse oxidativo ou a mudanças no comportamento em relação aos antibióticos analisados.

O uso de agentes antimicrobianos contra App é bastante amplo e, nos anos recentes, linhagens resistentes a diferentes antibióticos têm sido isoladas e / ou seus

plasmídeos caracterizados em diversas partes do mundo (ARCHAMBAULT et al., 2012; BOSSÉ et al., 2015b, 2017; COSTA, 2017; DA SILVA et al., 2017; DAYAO et al., 2016). A linhagem de App WT utilizada neste trabalho foi isolada no Reino Unido em 1995 (BOSSÉ et al., 2016), ocasião onde os antibióticos dos grupos das tetraciclínas, β -lactâmicos e macrolídios eram os mais utilizados no campo veterinário, sendo as tetraciclínas utilizadas primariamente na composição de rações (BURCH, 2005). Dentre os β -lactâmicos utilizados no controle de App, ampicilina foi um dos antibióticos mais utilizados em diversos países, incluindo o Reino Unido (BURCH, 2005) e o Brasil. A resistência à ampicilina e outros β -lactâmicos tem sido relatada por diversos pesquisadores (BURCH; SPERLING, 2018; DAYAO et al., 2016; EL GARCH et al., 2016), e o uso desta tem sido feita por combinações de β -lactâmicos com ácido clavulânico (BURCH; SPERLING, 2018). Assim como as tetraciclínas, até 1999 o macrolídeo tartarato de tilosina também era utilizado na composição de ração para aves e suínos, sendo que a frequência de App resistentes à tilosina naquele ano atingiu 90% dos isolados coletados na Inglaterra e País de Gales (TEALE; MARTIN; WATKINS, 2004). Com a proibição deste macrolídeo como aditivo alimentar, a resistência diminuiu gradativamente (BURCH, 2005) e o seu uso passou a ser amplamente utilizado de forma curativa no tratamento da pleuropneumonia suína (BURCH, 2010). Entretanto, em um trabalho recente, BOSSÉ et al. (2017) encontrou que 91% dos isolados de App isolados no Reino Unido apresentavam CIM acima de 32 $\mu\text{g/L}$, sendo considerados resistentes ao tartarato de tilosina se adotado o critério de ponto de corte da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Apesar do valor de CIM encontrado, os autores não detectaram nenhum gene para resistência à tilosina ou para outros macrolídeos nos isolados analisados, assim como nenhum ponto de mutação conhecido (BOSSÉ et al., 2017). Resultado similar foi encontrado em pesquisa realizada na

Austrália, onde os autores isolaram App, *Haemophilus parasuis* e *P. multocida* resistentes a macrolídeos, mas sem detectar genes para resistência (DAYAO et al., 2016), sugerindo que o mecanismo de resistência pode ser de outra natureza ou conferida por genes ainda não anotados para esta característica. No Brasil, em trabalho de 2017, foram encontrados que 99% dos isolados de App, provenientes de sete estados, foram resistentes à tilosina (COSTA, 2017).

A determinação do CIM para as linhagens investigadas neste trabalho não apresentou diferença em relação às linhagens parentais, sendo todas as linhagens consideradas sensíveis tanto para ampicilina quanto para tilosina. Entretanto, as linhagens WT_Δ*arrc14*; Δ*hfq_Δarrc14*, WT_Δ*rna04* e WT_Δ*rna02* apresentaram CIM de 8 µg/L, superior aos parentais e demais linhagens, que apresentaram CIM de 4 µg/L. Coincidentemente, destas quatro linhagens, três também apresentaram maior adesão em superfície abiótica (WT_Δ*arrc14*; Δ*hfq_Δarrc14* e WT_Δ*rna02*) e biótica (WT_Δ*arrc14*). Já é reconhecido que a presença de biofilme favorece a sobrevivência da bactéria, incluindo o aumento da resistência ao estresse causado pela presença de antibióticos (HATHROUBI et al., 2017a; NADELL et al., 2015; OLSEN, 2015). ARCHAMBAULT et al. (2012) observou que App crescendo como biofilme é menos sensível a antibióticos do que quando a mesma linhagem cresce na forma planquitônica. Este decréscimo na sensibilidade foi observado para diversos antibióticos, incluindo macrolídeos e β-lactâmicos. Alguns autores sugerem que esta diminuição da sensibilidade ocorre em função do sequestro do antibiótico pelos componentes da matriz do biofilme (HATHROUBI et al., 2017b; NADELL et al., 2015; OLSEN, 2015). Esta proposição pode ser sustentada por dois trabalhos distintos, onde a inibição da formação de biofilme por dispersina B (IZANO et al., 2007), ou pela inibição da bomba de efluxo (LI et al., 2016), mostraram que a sensibilidade a antibióticos aumentou. Estes trabalhos

corroboram com nossa proposição de que WT_Δ*arrc14* apresenta menor sensibilidade aos antibióticos tilosina e ampicilina em função do aumento da adesão, que é o passo inicial para a formação de biofilme.

Um dos principais fatores de virulência de App são as exotoxinas Apx, as quais são expressas de forma distinta entre os diversos sorotipos (KLITGAARD et al., 2012) e possuem padrões diferentes de atividade hemolítica e citotóxica (FREY, 2011). Para verificar a atividade hemolítica das linhagens parentais e mutantes nós originalmente realizamos a análise em placas de ágar sangue (INZANA et al., 1991), mas não obtivemos nenhuma alteração visível na formação de halo de hemólise (dados não mostrados). Posteriormente, realizamos o ensaio utilizando hemácias de carneiro incubadas com o sobrenadante das culturas das linhagens parentais e mutantes, os quais foram coletados no início da fase estacionária de cada linhagem. Novamente não observamos atividade hemolítica, que foi avaliada pela liberação de hemoglobina (dados não mostrados). Foi realizado então análise da atividade hemolítica incubando as hemácias diretamente com as bactérias, após lavagem para retirada do sobrenadante. Os dados obtidos para esta condição mostraram que as linhagens mutantes, com exceção da linhagem WT_Δ*arrc14*, apresentam atividade hemolítica atenuada quando comparada com a linhagem parental MIDG2331 WT. Entretanto, a linhagem WT_Δ*arrc14* apresentou atividade hemolítica superior ao parental WT. É pouco provável, porém não podemos afirmar, que esta atividade seja desempenhada pelas proteínas ApxII, que é a exotoxina produzida *in vitro* por App sorotipo 8. ApxII possui fraca atividade hemolítica e é secretada para o meio externo. A baixa presença da toxina Apx na superfície de App foi demonstrada por XU et al. (2006) em um trabalho de caracterização de um mutante para *apxIA*. Assim, a atividade hemolítica observada para as linhagens WT_Δ*arrc14* provavelmente possuem um outro mecanismo que não a hemólise por toxinas Apx.

A atividade hemolítica ocasionada pela endotoxina LPS já é conhecida há mais de seis décadas (NETER et al., 1958). Posteriormente, diversos trabalhos relacionaram a presença de LPS com a lise da membrana celular de diferentes células eucariotas (CARR; MORRISON, 1984; CIZNÁR; SHANDS, 1971; IKEDA; ITO; HONDA, 2004). Atualmente, a atividade hemolítica direta de LPS já está confirmada e é independente da ativação do sistema complemento e de linfócitos T CD4+ (BRAUCKMANN et al., 2016). Já foi demonstrado também que LPS está envolvido na maturação de biofilme (HATHROUBI et al., 2017b). LPS interage com o principal componente da matriz do biofilme, poli-N-Acetilglucosamina, por meio da cadeia O, auxiliando a adesão da célula bacteriana ao biofilme (HATHROUBI et al., 2015). Juntas, estas informações permitem sugerir que a hemólise promovida pela linhagem WT_Δ*arrc14* é mediada pela ação de um componente de adesão da célula bacteriana, que provavelmente atua facilitando o processo de formação de biofilme. Apesar das evidências direcionarem LPS como este componente de adesão, maiores esforços devem ser conduzidos para confirmar esta possibilidade.

Para avaliar a virulência das linhagens parentais e mutantes utilizamos o modelo alternativo *G. mellonella*. O uso de larvas desta mariposa como modelo de infecção é uma alternativa valiosa (PEREIRA et al., 2014), pois esse inseto possui um sistema relativamente avançado de defesas antimicrobianas e assim são mais promissores em gerar informações relevantes que possam ser extrapoladas para os modelos de infecção em mamíferos (LIONAKIS, 2011). Assim como estes, *G. mellonella* possui um complexo sistema de imunidade inata caracterizado por células da hemolinfa com capacidade fagocitária (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; SATYAVATHI; MINZ; NAGARAJU, 2014) e uma resposta humoral que inclui a produção de peptídeos antibacterianos (ELEFThERIANOS; REVENIS, 2011). Além destas características, as larvas de *G. mellonella* se mantêm fisiologicamente ativas a 37 °C, permitindo análises

em temperaturas ótimas de crescimento para *A. pleuropneumoniae* (PEREIRA et al., 2014). A partir do modelo de virulência utilizado, foi possível verificar que os sRNAs GcvB, RNA01, Arrc14 e Arrc16 estão provavelmente envolvidos com os mecanismos de virulência em App. Destes, a linhagem WT_Δ*rna01* apresentou a maior atenuação na virulência e WT_Δ*arrc14* promoveu aumento significativo na virulência. Todas as linhagens ΔsRNAs com o genótipo Δ*hfq* apresentaram atenuação da virulência (igual ou maior que a sua respectiva linhagem parental), o que vai de encontro com os trabalhos de SUBASHCHANDRABOSE et al. (2013) utilizando suínos e de CRISPIM (2014), que utilizou *G. mellonella* como modelo de infecção para avaliarem a deleção do gene para a chaperone de sRNAs, Hfq, na virulência de App de diferentes sorotipos.

O aumento da virulência verificado na linhagem WT_Δ*arrc14* corrobora com nossas proposições em relação aos demais dados obtidos. Conforme discutido anteriormente, a adesão é um mecanismo fundamental para o processo de colonização e os fatores envolvidos na adesão também se relacionam com a toxicidade para a membrana da célula hospedeira. Portanto, podemos sugerir que o sRNA Arrc14 é um sRNA *trans* que reprime a virulência de App modulando o processo de adesão da bactéria.

Por outro lado, os sRNA Arrc16 e RNA01 são sRNAs *trans* envolvidos positivamente na virulência, em mecanismo que não foi possível propor com base nos dados obtidos neste trabalho. Além de ter apresentado importante atenuação da virulência, a linhagem mutante para o sRNA RNA01 também apresentou diminuição na atividade hemolítica, apesar de ter mantido a adesão em superfície abiótica igual ao parental MIDG2331 WT. Para a adesão em células PK15, ocorreu atenuação de aproximadamente 25%, que não foi tão intensa quanto àquela observada para a linhagem Δ*hfq*. Com base nos dados obtidos para a linhagem WT_Δ*rna01*, buscamos avaliar sua habilidade em persistir e replicar no hospedeiro alternativo *G. mellonella*. Os

dados obtidos mostraram que, apesar da diminuição de bactérias na hemolinfa do inseto, com 12 horas após a infecção ainda é possível detectar App na hemolinfa de *G. mellonella*. A menor persistência da linhagem mutante em relação à sua parental condiz com os dados obtidos por PEREIRA et al., (2014), que encontrou diferença na persistência de isolados de App sorotipo 8 com diferentes padrões de virulência. Segundo a autora, o sistema imune da larva é hábil em eliminar mais rapidamente isolados menos virulentos, enquanto que os isolados mais virulentos conseguem evadir do sistema imune e se proliferarem. Os dados obtidos neste estudo mostraram persistência de 12 horas para uma linhagem de baixa virulência e vão de encontro com a natureza multifatorial do processo de virulência em App.

GcvB: um sRNA regulador do metabolismo de aminoácidos

O sRNA GcvB foi utilizado como balizador de nossos experimentos *in silico*. GcvB é um *trans*-sRNAs altamente conservado associado a Hfq em bactérias Gram-negativas e já foi relatado como capaz de regular vários transportadores ABC para aminoácidos (SHARMA et al., 2011). Muitos dos alvos originalmente preditos para GcvB já foram comprovados experimentalmente (WRIGHT et al., 2013) e em *Salmonella enterica* já foi mostrado que GcvB é o principal regulador do metabolismo de aminoácidos e está envolvido com a regulação de 1% de todos os mRNAs desta bactéria.

A distribuição de GcvB no domínio Bactéria é bastante ampla (PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2008). O banco de dados Rfam possui 234 sequências depositadas para GcvB (família RF00022) (KALVARI et al., 2018). Estas sequências estão distribuídas em 219 espécies bacterianas dentro das ordens Vibrionales, Enterobacterales e Pasteurellales, além de algumas sequências que foram

depositadas a partir de isolamentos de organismos do domínio Eucaria (Figura S2). Em nossas análises, nós obtivemos 43 homólogos, todos pertencentes à família Pasteurellaceae (ordem Pasteurellales). Alguns homólogos que estão depositados no banco de dados Rfam, não foram detectados em nossas análises. Por outro lado, fomos hábeis em detectar homólogos para GcvB que ainda não estão depositados no banco Rfam. Esta discrepância no número de homólogos para GcvB obtidos por nós e constantes em Rfam pode ser explicada pela metodologia que utilizamos para pesquisa de homólogos. Em nossos parâmetros de busca através da ferramenta GLASSgo trabalhamos com um ponto de corte de 52% de identidade, além de utilizar um modelo de covariância que considera a estrutura secundária na busca dos homólogos. Isso fica evidente quando comparamos, por BLASTn, a sequência de GcvB de *Escherichia coli* K12 (206 nucleotídeos) em relação ao GcvB de App MIDG2331 (173 nucleotídeos) (Figura S3), que retorna uma identidade de 76% para uma sequência de 79 nucleotídeos, o que corresponderia a aproximadamente 79% de identidade. Se considerarmos a extensão completa do GcvB de App MIDG2331, que possui 173 nucleotídeos, teríamos uma identidade de aproximadamente 35%, que se encontra abaixo do ponto de corte por nós estabelecido. Apesar disso, duas regiões altamente conservadas foram encontradas em todos os nossos homólogos e uma destas regiões coincide com a sequência consenso descrita para GcvB (PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2008). A segunda sequência conservada também é encontrada nos homólogos depositados no banco Rfam. As duas sequências são apresentadas na Figura S4 e podem ser observadas na Figura 29A, onde correspondem às regiões de maior densidade de interação GcvB-mRNAs. Estes dados vão de encontro com os obtidos por WRIGHT et al. (2013) que utilizou metodologia similar para prever alvos para GcvB de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. O autor encontrou duas regiões de alta densidade de interação GcvB-mRNAs, as quais abrangem as sequências conservadas por nós deduzidas para os homólogos de

GcvB de App MIDG2331. Além disso, estas regiões foram experimentalmente observadas por SHARMA et al. (2011) como regiões alvos de interação GcvB – mRNAs para a bactéria *Salmonella enterica*.

A precisão da nossa abordagem utilizada na predição de alvos foi comprovada pelas predições utilizadas para GcvB. Conforme citado anteriormente, este sRNA tem um conjunto amplo de mRNAs alvos experimentalmente confirmados para Enterobacteriaceas e uma função claramente definida como um regulador do metabolismo e transporte de aminoácidos (MELAMED et al., 2016; MIYAKOSHI; CHAO; VOGEL, 2015b; SHARMA et al., 2011). Nós obtivemos 73 predições de mRNAs alvos para GcvB de App MIDG2331 ($P \leq 0,01$). Destes alvos, 33% deles se relacionaram com metabolismo, sendo destes, 35% envolvidos diretamente com o metabolismo de aminoácidos (Figura 22B). Além disso, foram preditos 17 alvos associados com o transporte. Estes alvos foram categorizados dentro da tabela Kegg como envolvidos no processamento da informação ambiental (Figura 16B) e correspondem a 26% dos alvos preditos. A partir dos alvos que apresentaram interações na rede de interações entre proteínas obtidas pela ferramenta STRING (Figura 22A), nós obtivemos um enriquecimento funcional significativo (Figura 22B) que indicaram uma clara associação destes alvos com funções metabólicas associadas aos processos metabólicos e biossintéticos de componentes nitrogenados e organonitrogenados. Estes dados vão de encontro com aqueles obtidos por WRIGH et al. (2013) que realizou o enriquecimento de alvos preditos para GcvB de *Escherichia coli* e obteve uma anotação significativa (utilizando a ferramenta de anotação e enriquecimento DAVID) para 70% dos alvos como sendo “processos biossintéticos de aminoácidos celulares” e também são amparados pelos resultados experimentais de SHARMA et al. (2011), MIYAKOSHI et al. (2015) e MELAMED et al. (2016). Assim, nossos resultados para a predição de alvos de GcvB de App MIDG2331, bem como o enriquecimento funcional destes alvos, validam nossa

estratégia de análise *in silico* para os sRNAs RNA01, RNA02, Arrc14 e Arrc16, que são os sRNAs para os quais obtivemos homólogos. Além disso, nossos resultados também complementam achados experimentais existentes e agregam vários candidatos plausíveis.

Distribuição filogenética dos sRNAs

Para avaliar se a distribuição dos sRNA entre os homólogos possuía alguma relação com o hospedeiro que cada espécie infecta, realizamos uma análise filogenética baseando-se na sequência dos sRNAs dos homólogos. Uma árvore filogenética com base no gene 16S rDNA de cada homólogo também foi confeccionada, visando uma avaliação prévia para verificar se a distribuição dos sRNAs ocorre de acordo com a descendência dos homólogos. Nós podemos observar, com base nas Figuras 16D, 17D, 18D, 19D e 20D, que a distribuição dos homólogos não obedece uma relação com os hospedeiros de cada espécie. *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Actinobacillus suis* sempre se agruparam com *Actinobacillus equuli*, mesmo os primeiros sendo patógenos de suínos e o último de equinos (SASSU et al., 2017). Da mesma forma, *Glaesserella parasuis*, que também é um patógeno de suíno (WATT et al., 2018), permaneceu em todas as análises em um grupamento distante dos demais patógenos de suínos. Além disso, *Haemophilus ducreyi*, que foi encontrado como homólogo para os sRNAs GcvB, RNA01, RNA02 e Arrc16, se agrupou sempre no mesmo clado que as demais espécies do gênero *Actinobacillus*. *Haemophilus ducreyi* é um patógeno que causa lesões ulcerativas sexualmente transmissíveis em humanos (LEWIS; MITJÀ, 2016).

Apesar dos sRNAs serem amplamente difundidos dentro dos domínios Bacteria e Arqueia, tanto suas posições filogenéticas quanto seus mecanismos de origem evolutivas permanecem em grande parte obscuros (WRIGHT et al., 2013). Entretanto, apesar dos desafios associados com a identificação de sRNAs e do seu acompanhamento durante a escala evolutiva (DUTCHER; RAGHAVAN, 2018), três mecanismos que explicam a

emergência dos sRNA já foram propostos: (i) a duplicação, como por exemplo os sRNAs OmrA e OmrB em *Escherichia coli* (PAPENFORT; VOGEL, 2009); (ii) a transferência horizontal de genes, que é talvez a fonte conhecida mais comum para a origem de sRNAs. Um exemplo de sRNA obtido por transferência horizontal de genes é o sRNA IsrK, originado de um profago e codificado a partir de uma ilha de patogenicidade de *Salmonella* (HERSHKO-SHALEV et al., 2016). O terceiro mecanismo conhecido para a origem dos sRNAs é (iii) a origem *de novo*. À medida que mais sRNAs são identificados e caracterizados e suas origens elucidadas, a origem *de novo* a partir de transcritos aparentemente não funcionais também tem sido observada. Os rearranjos genômicos, como os que ocorrem por recombinação homóloga, podem formar novas regiões intergênicas, a partir das quais novos sRNAs podem surgir (DUTCHER; RAGHAVAN, 2018). Um exemplo de sRNA com origem *de novo* é o SesR2, identificado em alguns sorotipos de *Salmonella enterica* (RAGHAVAN et al., 2015). RNA04 (Figura 28) foi o sRNA que apresentou o menor número de alvos preditos, além de não ter sido observado em outras espécies de Pasteurellaceae. Estas duas características podem indicar que RNA04 é um sRNA relativamente jovem na escala evolutiva e que sua origem seja por síntese *de novo*. Análises de sintenia em relação à região *downstream* de RNA04 são necessárias para confirmar se a sua origem ocorre por síntese *de novo* ou por outro mecanismo.

Para os sRNAs que apresentaram homólogos, nós buscamos comparar a distribuição filogenética dos sRNAs com a do gene 16S rDNA. A distribuição de todos os sRNAs dentro do gênero *Actinobacillus* apresentou a mesma distribuição filogenética que a observada para o gene 16s rDNA (Figuras 16D, 17D, 18D, 19D e 20D), bem como de *Haemophilus ducreyi* para GcvB, RNA01, RNA02 e Arrc16, indicando uma herança obtida por transferência vertical para estas espécies. Quanto à distribuição dos demais homólogos, o posicionamento de *Bibersteinia trealosi* observado para GcvB e RNA01

(Figuras 16D e 17D) e de *Haemophilus parainfluenza* para Arrc16 (Figura 20D), quando comparado com a posição destas espécies nas árvores filogenéticas obtidas pela análise do gene 16S rDNA, podem ser um indicativo da presença de transferência horizontal de genes para estes sRNAs nestas espécies. Esta hipótese é fortalecida para RNA01 dado a identificação de um homólogo no genoma do fago *Mannheimia* vB Mhs 535AP2. Apesar destes indicativos, a previsão da transferência horizontal de genes em genomas bacterianos é um esforço complexo, pois a simples análise dos alinhamentos pode levar a falsas conclusões (KOONIN; MAKAROVA; ARAVIND, 2001). Embora ferramentas atuais de bioinformáticas tenham sido projetadas para detectar a transferência horizontal de genes em grupos evolutivamente distantes (ZHU; KOSOY; DITTMAR, 2014), essa tarefa é mais difícil em genomas estreitamente relacionados, em rápida evolução, como os da família Pasteurellaceae, e dependem do estabelecimento de árvores filogenéticas robustas (BOC; PHILIPPE; MAKARENKOV, 2010). Assim, nossos resultados para as análises filogenéticas comparativas entre os sRNAs e o gene 16S rDNA é um indicativo de linha a ser posteriormente estudada, e não uma consideração final.

A interação sRNA-mRNA ocorre em regiões altamente conservadas do sRNA

O alinhamento entre os homólogos de cada sRNA permitiu encontrar regiões altamente conservadas. Com exceção de Arrc14, estas regiões ocorrem na porção central do sRNA e próximo ao terminal 3'OH (Figuras 16, 17, 18 e 20, partes A e B), onde está posicionada a região de terminação da transcrição e encontramos uma sequência rica em timina. Para o sRNA Arrc14 observamos regiões altamente conservadas em toda a extensão da molécula (Figura 19A e B).

Estas regiões altamente conservadas eram esperadas, uma vez que um sRNA geralmente interage com vários mRNAs no mesmo local de interação (Tabelas 10 – 15 e

Figuras 29 - 34). Como consequência, é provável que a região de ligação ao alvo no sRNA mostre alta conservação, pois espera-se que o emparelhamento de bases com múltiplos alvos restrinja a evolução do sRNA (MOON; GOTTESMAN, 2011). Nossos resultados para as regiões de interação entre sRNA-mRNA comprovam esta premissa, conforme pode ser observado nas Figuras 29 a 34, onde a densidade de interações nos sRNAs confere com as regiões conservadas por nós detectadas. Nossos resultados são suportados pelos dados obtidos por RICHTER e BACKOFEN (2012). Pesquisando a conservação da interação sRNA-mRNA de 71 alvos, experimentalmente comprovados para *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, estes autores mostraram que as sequências conservadas dos sRNAs destas espécies estão envolvidas com a interação com diferentes mRNAs. Segundo os autores, se houvesse apenas um alvo, a sequência de sRNA e mRNA presumivelmente teriam coevoluído. Posteriormente, PEER e MARGALIT (2014), estudando o padrão evolutivo da regulação de sRNAs em *Escherichia coli*, mostraram que os sRNAs são evolutivamente mais velhos do que a maioria de seus mRNAs alvos. É concebível que, o estabelecimento das primeiras interações forçou a pressão seletiva nos sRNAs, após o que alvos adicionais foram adquiridos pela adaptação de um sítio de ligação à região ativa do sRNA. Esta conjectura é suportada pelo aparecimento de muitos locais de ligação nos mRNAs alvo apenas após o ganho de sRNA, apesar da presença prévia do gene alvo nos genomas ancestrais (PEER; MARGALIT, 2014). Além disso, o fato de sRNAs normalmente terem como alvo múltiplos mRNAs também é uma característica que explica o fato do número de mRNAs ligados a Hfq ser consideravelmente maior do que o número de sRNAs associados a Hfq (BACKOFEN; HESS, 2010).

Os alvos preditos para os sRNAs possuem uma miríade de funções biológicas

O papel biológico dos sRNAs é frequentemente deduzido a partir do conhecimento sobre seus mRNAs alvos. A ligação do sRNA ao mRNA alvo, auxiliada pelas chaperones Hfq ou proQ, pode resultar tanto em mudanças na eficiência da tradução como na instabilidade do transcrito, regulando assim importantes atividades celulares em condições normais ou em situação de estresse (LAVI-ITZKOVITZ et al., 2014). Através das ferramentas CopraRNA ou IntaRNA nós fomos hábeis em encontrar potenciais alvos para os nossos sRNAs (Tabelas 11 – 15). A partir destes alvos, e para explorar suas funções, nós criamos uma rede de interações entre as proteínas, codificadas a partir dos mRNAs alvos preditos, buscando elucidar o papel biológico dos nossos sRNAs. Além disso, enriquecemos os nós desta rede para visualizar funções biológicas ocultas. As redes de interações obtidas (Figuras 22 – 26 e 28) indicaram que a regulação de processos celulares pode envolver uma interação complexa entre os sRNAs e seus respectivos alvos, com atividades biológicas distintas. Para todos os sRNAs, encontramos alvos que atuam em processos envolvidos no tratamento da informação ambiental, genética, metabolismo e em processos celulares. Resultados semelhantes têm sido obtido por diversos pesquisadores e, uma variedade de alvos com diferentes papéis biológicos tem sido associada a sRNAs (BEISEL; STORZ, 2011; GOTTESMAN; STORZ, 2011; MICHAUX et al., 2014; RAMOS et al., 2013; WEIGEL; DEMUTH, 2016; WRIGHT et al., 2013). Após realizar o enriquecimento da rede para cada sRNA, foi possível classificar sub-redes de acordo com a função e implicar os sRNAs como reguladores de processos celulares específicos. Assim, pudemos observar que RNA01 (Figura 23) provavelmente está associado a processos envolvidos na formação do envelope, tanto através de mecanismos relacionados com a síntese de membrana externa, pela produção de lipídio A, como no metabolismo de lipopolissacarídeos e de carboidratos. RNA02 (Figura 24), por sua vez, além dos processos envolvidos na formação de envelope também está associado com a

biossíntese de aminoácidos e de metabólitos secundários, como terpenoides. Arrc14 (Figura 25) apresentou enriquecimento evidente no processamento da informação genética, com a revelação de processos envolvidos tanto na tradução quanto no controle da expressão gênica, além de apresentar envolvimento em processos metabólicos primários e associados a macromoléculas. Arrc16 (Figura 26) também apresentou enriquecimento em processos semelhantes a Arrc14. Entretanto, foi o único sRNA onde foi possível observar evidências de atuação em um processo biológico sem a necessidade de enriquecimento funcional de sua rede de interação. Os alvos preditos para Arrc16 (Tabela 14 e Figura 26) indicaram uma atividade em rotas envolvidas com o metabolismo de nitrogênio (Figura 27).

A rede de interação confeccionada a partir dos alvos preditos para RNA04 mostrou baixa complexidade de interações. Entretanto, após o enriquecimento funcional dos nós (Figura 28), revelou-se ação acentuada sobre o metabolismo, abrangendo em especial as vias metabólicas centrais do metabolismo.

As análises de rede de interação, anotação e enriquecimento funcional dos mRNAs alvos preditos permitiram a visualização de funções biológicas e, adicionalmente, sugeriram processos biológicos importantes para os sRNAs. A topologia das redes também demonstrou conectividade entre processos funcionais que alude os sRNAs na coordenação de um comportamento global de resposta. Este comportamento global tem sido observado em diversos sRNAs. GcvB, por exemplo, exibe complexa rede de atuação, com destaque para o metabolismo e transporte de aminoácidos, em *Escherichia coli* (PULVERMACHER; STAUFFER; STAUFFER, 2009). O sRNA GlmZ e seu homólogo GlmY, possuem funções distintas de regulação da expressão do gene *glmS* e atuam promovendo a expressão de adesinas Curli, reprimindo a expressão do metabolismo do aminoácido triptofano e promovendo a expressão de genes de resistência ao estresse ácido (GRUBER; SPERANDIO, 2015).

As anotações funcionais em nossa rede, possibilitadas pela identificação de um grande número de possíveis alvos para sRNAs de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331, fornecem uma base robusta para uma maior exploração dos papéis funcionais dos sRNAs.

Arrc14 regula o metabolismo de amino açúcares e nucleotídeos açúcares

O mRNA alvo MIDG2331_RS01730, predito para Arrc14 como alvo que apresentou melhor combinação de *p-value* e região de interação entre os alvos preditos para este sRNA (Figura 31A), é homólogo do gene *rapZ* (Figura 35), descrito para diferentes bactérias, incluindo para *Escherichia coli* (PAPENFORT; VOGEL, 2014). A proteína RapZ é uma nuclease que atua sobre o sRNA GlmZ e dessa forma modula a expressão do gene *glmS*. Quando a concentração de glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) está elevada na célula, RapZ liga-se a GlmZ e permite que a endonuclease RNase E degrade GlmZ. Conseqüentemente, GlmZ é inativado e não permite a tradução do mRNA *glmS*. Sob baixa concentração de GlcN6P, RapZ é sequestrado por um outro sRNA, GlmY, impedindo assim a degradação de GlmZ. Nesta condição, GlmZ se associa à chaperona Hfq e reconhecem a região 5'UTR do mRNA de *glmS*, desfazendo uma alça que bloqueia o sítio RBS e permitindo assim a sua tradução (KALAMORZ et al., 2007; URBAN; VOGEL, 2008). A produção de LPS, peptidoglicano e fibras Curli, envolvidas no processo de adesão celular, é favorecida quando *glmS* é traduzido (GÖPEL; KHAN; GÖRKE, 2014). O gene *glmS* está identificado no genoma de App MIDG2331 como MIDG2331_RS08910.

Nós identificamos no mRNA MIDG2331_RS01730 um sítio de clivagem da RNase E (CHAO et al., 2017; JIANG; DIWA; BELASCO, 2000) imediatamente *downstream* à região *seed* de interação do sRNA Arrc14 (Figura 35). Portanto, nós

propomos que o mecanismo de ação de Arrc14 ocorre através do impedimento da ação de RNase E sobre o mRNA MIDG2331_RS1730, permitindo assim a sua tradução e consequente atividade de nuclease sobre o sRNA GlmZ, o que por sua vez impede a tradução do mRNA de glmS. Esta hipótese é suportada pelos nossos resultados experimentais, onde o mutante MIDG2331 para Arrc14 apresenta um fenótipo de maior adesão em superfície biótica e abiótica, atividade hemolítica aumentada e aumento da virulência no hospedeiro alternativo *Galleria mellonella*. A Figura 39 ilustra o mecanismo proposto para a ação do sRNA Arrc14.

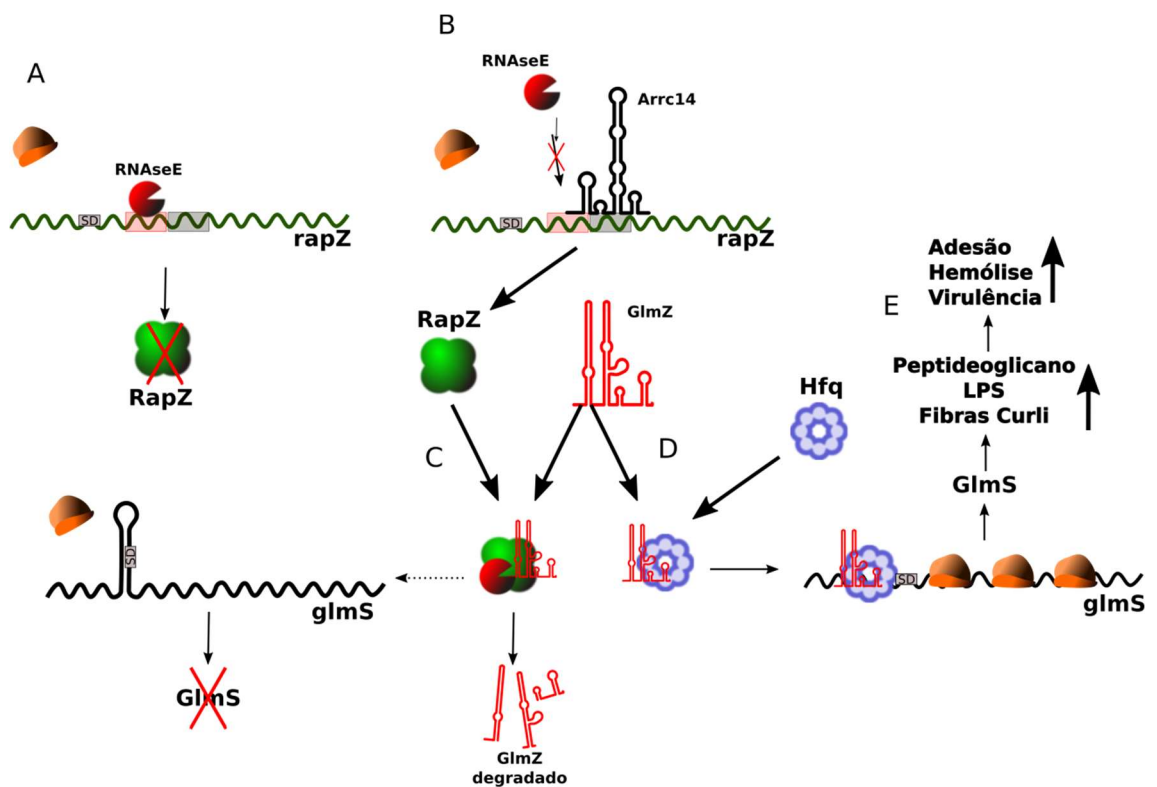


Figura 39. Mecanismo de ação proposto para Arrc14. **A** – Na ausência de Arrc14 o mRNA da nuclease RapZ (MIDG_RS01730) sofre degradação pela RNase E, que reconhece o mRNA em sítio (retângulo rosa) adjacente à região de interação de Arrc14 (retângulo cinza). **B** – Na presença de Arrc14 a degradação de rapZ é inibida e ocorre a síntese de RapZ. **C** – RapZ promove a degradação do sRNA GlmZ, impedindo que ele promova a liberação da região de Shine-Dalgarno do mRNA glmS (MIDG_RS08910). **D** – GlmZ pode interagir com a chaperona Hfq, impedindo sua degradação e facilitando a interação de ribossomos com glmS para a síntese de GlmS. **E** – GlmS está envolvido na rota anabólica de amino açúcares e nucleotídeo açúcares, promovendo o aumento da expressão de peptidoglicano, LPS e fibras de adesão do tipo Curli.

CONCLUSÕES

Este estudo investigou a relação de seis RNAs pequenos reguladores em *trans* sobre diferentes fenótipos em *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Os resultados obtidos em relação ao perfil de crescimento, capacidade de adesão em superfícies biótica e abiótica, suscetibilidade a agentes estressantes e a antibióticos, capacidade de promover hemólise e perfil de virulência em *Galleria mellonella*, indicam que RNA01, RNA02, RNA04 e Arrc16 estão envolvidos com a manutenção dos aspectos básicos da virulência, enquanto que Arrc 14 regula negativamente a virulência de App. Além disso, as análises *in silico* permitiram definir regiões conservadas para os sRNA que apresentaram homólogos, avaliar sua distribuição filogenética, predizer os alvos mRNA e inferir sobre a função biológica de cada sRNA. As predições para o sRNA Arrc14 possibilitou ainda propor um mecanismo biológico de atuação que corrobora com os dados obtidos na caracterização fenotípica para as linhagens *knockouts* de Arrc14. Nós concluimos, portanto, que os sRNAs aqui estudados interferem de forma distinta na regulação da virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8. Concluimos ainda que, com base nos dados obtidos para RNA01, a linhagem WT_Δ*rna01* possui potencial para ser utilizada no desenvolvimento de uma vacina atenuada viva para prevenir e controlar infecções por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

REFERÊNCIAS

- ÅBERG, C. H.; KELK, P.; JOHANSSON, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. **Virulence**, v. 6, n. 3, p. 188–195, 2015.
- AMARASINGHE, J. J. et al. Novel iron-regulated and Fur-regulated small regulatory RNAs in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 327–349, 2012.
- ANGELICHIO, M. J.; CAMILLI, A. *In Vivo* expression technology. **Society**, v. 70, n. 12, p. 6518–6523, 2002.
- ANTENUCCI, F. et al. Identification and characterization of serovar-independent immunogens in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2017.
- ARCHAMBAULT, M. et al. Antimicrobial Susceptibilities and Resistance Genes of Canadian Isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 2, p. 198–206, 2012.
- ARGAMAN, L. et al. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. **Current Biology**, v. 11, n. 12, p. 941–949, 1 jan. 2001.
- AUGER, E. et al. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells T. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1426–1441, 1 abr. 2009.
- AZAM, M. S.; VANDERPOOL, C. K. Translational regulation by bacterial small RNAs via an unusual Hfq-dependent mechanism. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 5, p. 2585–2599, 2017.
- BACKOFEN, R.; HESS, W. R. Computational prediction of sRNAs and their targets in bacteria. **RNA Biology**, v. 7, n. 1, p. 37–41, 2010.
- BAK, G. et al. Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 5, n. September, p. 1–19, 2015.
- BALTES, N.; BUETTNER, F. F. R.; GERLACH, G. F. Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1–3, p. 110–121, 2007.
- BALTES, N.; HENNIG-PAUKA, I.; GERLACH, G. Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p. 283–287, 2002.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–97, 2004.
- BATEMAN, A. et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 4 jan. 2017.
- BEISEL, C. L.; STORZ, G. Networks. **FEMS Microbiology Review**, v. 34, n. 5, p. 866–882, 2011.
- BHADURI, S.; WESLEY, I. V. **Advances in Yersinia Research**. New York, NY: Springer New York, 2012. v. 954
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **Bmj**, v. 317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998.
- BOC, A.; PHILIPPE, H.; MAKARENKOV, V. Inferring and validating horizontal gene transfer events using bipartition dissimilarity. **Systematic Biology**, v. 59, n. 2, p. 195–211, 2010.
- BOSSÉ, J. T. et al. Harnessing natural transformation in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: A simple method for allelic replacements. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 2, p. 277–281, 2004.
- BOSSÉ, J. T. et al. Natural competence in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Research letter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, n. 1, p. 124–130, 2009.
- BOSSÉ, J. T. et al. A Unique Capsule Locus in the Newly Designated *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovar 16 and Development of a Diagnostic PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 902–907, mar. 2017.
- BOSSÉ, J. T. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Pathobiology and pathogenesis of infection. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 225–235, 2002.

- BOSSÉ, J. T. et al. Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary microbiology**, v. 178, n. 3, p. 279–282, 2015a.
- BOSSÉ, J. T. et al. Complete Genome Sequence of MIDG2331, a Genetically Tractable Serovar 8 Clinical Isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. e01667-15, 2016.
- BOSSÉ, J. T. et al. Identification of *dfrA14* in two distinct plasmids conferring trimethoprim resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 8, p. 2217–2222, 2015b.
- BOSSÉ, J. T. et al. The generation of successive unmarked mutations and chromosomal insertion of heterologous genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* using natural transformation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111252, 2014.
- BOSSÉ, J. T. et al. Whole genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 6–11, 2017.
- BRAUCKMANN, S. et al. Lipopolysaccharide-induced hemolysis: Evidence for direct membrane interactions. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.
- BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597–603, 2013.
- BUJOLD, A. R.; MACINNES, J. I. Identification of putative adhesins of *Actinobacillus suis* and their homologues in other members of the family Pasteurellaceae. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 675, 2015.
- BURCH, D. G. S.; SPERLING, D. Amoxicillin-current use in swine medicine. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, n. December 2016, 2018.
- BURCH, D. G. S. Antimicrobial concentrations in plasma and lung and their relationships to bacterial respiratory infections. **The Pig Journal**, v. 63, p. 34–49, 2010.
- BURCH, D. Problems of antibiotic resistance in pigs in the UK. **In Practice**, v. 27, n. 1, p. 37–43, 2005.
- CAMERON, A. et al. Hyperosmotic Stress Response of *Campylobacter jejuni*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6116–6130, 2012.
- CARR, C.; MORRISON, D. C. Lipopolysaccharide Interaction. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 2, p. 600–606, 1984.
- CARVER, T. et al. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012.
- CAVANAGH, A. T.; WASSARMAN, K. M. 6S RNA, a Global Regulator of Transcription in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and Beyond. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 45–60, 2014.
- CHAMBERS, J. R.; SAUER, K. Small RNAs and their role in biofilm formation. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 39–49, jan. 2013.
- CHAO, Y. et al. *In vivo* cleavage map illuminates the central role of RNase E in coding and non-coding RNA pathways. **Molecular Cell**, v. 65, n. 1, p. 39–51, 2017.
- CHAO, Y.; VOGEL, J. The role of Hfq in bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 24–33, 2010.
- CHAREYRE, S.; MANDIN, P. Bacterial Iron Homeostasis Regulation by sRNAs. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 5 abr. 2018.
- CHASE, C. C. L.; LUNNEY, J. K. Immune System. In: I. ZIMMERMAN, J. J. (Ed.). **Diseases of Swine**. 10. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 227–250.
- CHIEN, M. S. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 3–4, p. 327–333, 2009.
- CHIERS, K. et al. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the APX toxins. **Veterinary Quarterly**, v. 20, n.

2, p. 65–69, abr. 1998.

CHIERS, K. et al. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**, v. 41, n. 5, 2010.

CHRISTENSEN, H. et al. The Family Pasteurellaceae. In: **The Prokaryotes**. 4. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 535–564.

CIZNÁR, I.; SHANDS, J. W. Effect of alkali-treated lipopolysaccharide on erythrocyte membrane stability. **Infection and Immunity**, v. 4, n. 4, p. 362–367, 1971.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 28, n. July, p. 1–99, 2009.

COSTA, L. P. B. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros (Tese)**. [s.l.] USP, 2017.

CRISPIM, J. S. **Envolvimento da chaperona Hfq na virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae***. (dissertação) 62p; Universidade Federal de Viçosa., 2014.

CUCCUI, J. et al. The N-linking glycosylation system from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is required for adhesion and has potential use in glycoengineering. **Open Biology**, v. 7, n. 1, p. 160212, 11 jan. 2017.

CUN, Y.; FRÖHLICH, H. Network and data integration for biomarker signature discovery via network smoothed T-statistics. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

DA SILVA, G. C. et al. p518, a small floR plasmid from a South American isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 204, n. April, p. 129–132, 2017.

DAI, H. BMC Bioinformatics. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 1–13, 2007.

DAYAO, D. et al. Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs. **Australian veterinary journal**, v. 94, n. 7, p. 227–231, 2016.

DEL POZO SACRISTAN, R. et al. Efficacy of vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in two Belgian farrow-to-finish pig herds with a history of chronic pleurisy. **Veterinary Record**, v. 174, n. 12, p. 302–302, 2014.

DONACHIE, W.; LAINSON, F. A.; HODGSON, J. C. ***Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella***. Boston, MA: Springer US, 1995. v. 53

DUBREUIL, J. D. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 1, n. 2, p. 73–93, 2000.

DUTCHER, H. A.; RAGHAVAN, R. Origin, evolution, and loss of bacterial small RNAs. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 2, 2018.

EGGENHOFER, F.; HOFACKER, I. L.; HÖNER ZU SIEDERDISSEN, C. RNAlien - Unsupervised RNA family model construction. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 17, p. 8433–8441, 2016.

EL GARCH, F. et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe, 2009–2012: VetPath results. **Veterinary Microbiology**, v. 194, p. 11–22, out. 2016.

ELEFTHERIANOS, I.; REVENIS, C. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 1, p. 28–33, 2011.

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015–1019, 2016.

FABLET, C. et al. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 627–630, 2012.

FOOTE, S. J. et al. The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b). **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 4, p. 1495–1496, 2008.

- FRAILE, L. et al. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. **Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 326–333, 2010.
- FRANCESCHINI, A. et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 808–815, 2013.
- FREY, J. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic Pasteurellaceae. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 51–58, 2011.
- FREY, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 257–260, 1995.
- FREY, J.; KUHNERT, P. RTX toxins in Pasteurellaceae. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 292, n. 3–4, p. 149–158, 2002.
- FRÖHLICH, K. S. et al. A conserved RpoS-dependent small RNA controls the synthesis of major porin OmpD. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 8, p. 3623–3640, 2012.
- FUENTES, D. N. et al. Motility modulation by the small non-coding RNA SroC in *Salmonella* Typhimurium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 17, p. fnv135, 2015.
- FULLER, T. E.; KENNEDY, M. J.; LOWERY, D. E. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 29, n. 1, p. 25–38, 2000.
- GONZALEZ, G. M. et al. Structural insights into RapZ-mediated regulation of bacterial amino-sugar metabolism. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 18, p. 10845–10860, 2017.
- GÖPEL, Y.; KHAN, M. A.; GÖRKE, B. Ménage à trois: Post-transcriptional control of the key enzyme for cell envelope synthesis by a base-pairing small RNA, an RNase adaptor protein, and a small RNA mimic. **RNA Biology**, v. 11, n. 5, 2014.
- GOTTESMAN, S. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 303–328, 2004.
- GOTTESMAN, S.; STORZ, G. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, p. a003798–a003798, 1 dez. 2011.
- GOTTSCHALK, M.; LACOUTURE, S. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 3, 6, 8 and 15 isolated from diseased pigs in North America. **Veterinary Record**, v. 174, n. 18, p. 452, 2014.
- GRUBER, C. C.; SPERANDIO, V. Global analysis of posttranscriptional regulation by GlmY and GlmZ in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1286–1295, 2015.
- GULLIVER, E. L. et al. Determination of the small RNA GcvB regulon in the Gram-negative bacterial pathogen *Pasteurella multocida* and identification of the GcvB seed binding region. **RNA**, v. 24, n. 5, p. 704–720, 12 maio 2018.
- HABRUN, B. et al. Porcine pleuropneumonia: The first evaluation of field efficacy of a subunit vaccine in Croatia. **Veterinarni Medicina**, v. 47, n. 8, p. 213–217, 2002.
- HAESEBROUCK, F. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 3–4, p. 255–268, 2004.
- HALLER, A. et al. Folding and ligand recognition of the TPP riboswitch aptamer at single-molecule resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 11, p. 4188–4193, 2013.
- HAN, Y. et al. Regulation of pathogenicity by noncoding RNAs in bacteria. **Future Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 579–591, 2013.
- HATHROUBI, S. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms: Role in pathogenicity and potential impact for vaccination development. **Animal Health Research Reviews**, p. 1–14, 2017b.
- HATHROUBI, S. et al. Biofilms: microbial shelters against antibiotics. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 2, p. 147–156, 2017a.
- HATHROUBI, S. et al. Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 1, p. 127–137, 2015.

HEROVEN, A. K.; NUSS, A. M.; DERSCH, P. RNA-based mechanisms of virulence control in Enterobacteriaceae. **RNA Biology**, v. 14, n. 5, p. 471–487, 2017.

HERSHKO-SHALEV, T. et al. Gifsy-1 Prophage IsrK with dual function as small and messenger RNA modulates vital bacterial machineries. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 4, p. 1–31, 2016.

HO, T. D.; ELLERMEIER, C. D. Ferric uptake regulator fur control of putative iron acquisition systems in *Clostridium difficile*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 18, p. 2930–2940, 2015.

HOBBS, E. C.; ASTARITA, J. L.; STORZ, G. Small RNAs and small proteins involved in resistance to cell envelope stress and acid shock in *Escherichia coli*: Analysis of a bar-coded mutant collection. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 59–67, 2010.

HOLMQVIST, E. et al. Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis. **EMBO Journal**, v. 29, n. 11, p. 1840–1850, 2010.

IKEDA, M.; ITO, S.; HONDA, M. Hemolytic uremic syndrome induced by lipopolysaccharide and Shiga-like toxin. **Pediatric Nephrology**, v. 19, n. 5, p. 485–489, 2004.

IM, H. The Inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: “Ultra Competent” Cells. **BIO-PROTOCOL**, v. 1, n. 20, 2011.

INZANA, T. J. et al. Characterization of a non-hemolytic mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5: role of the 110 kilodalton hemolysin in virulence and immunoprotection. **Microbial Pathogenesis**, v. 10, n. 4, p. 281–296, 1991.

IZANO, E. A. et al. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2007.

JACQUES, M. Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 450, p. 81–85, 2004.

JIANG, X.; DIWA, A.; BELASCO, J. G. Regions of RNase e important for 5' -end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. v. 182, n. 9, p. 2468–2475, 2000.

JIN, Y. et al. Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 165, 2009.

JIRAWATTANAPONG, P.; L, V. L. Efficacy of a subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an endemically infected swine herd. v. 16, n. 4, p. 193–199, 2007.

JORGENSEN, M. G. et al. Small regulatory RNAs control the multi-cellular adhesive lifestyle of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 36–50, 2012.

KALAMORZ, F. et al. Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1518–1533, 2007.

KALVARI, I. et al. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D335–D342, 4 jan. 2018.

KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. v. 45, n. November 2016, p. 353–361, 2017.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KAZANOV, M. D.; VITRESCHAK, A. G.; GELFAND, M. S. Abundance and functional diversity of riboswitches in microbial communities. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1–9, 2007.

KERY, M. B. et al. TargetRNA2: Identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 124–129, 2014.

KINGSFORD, C. L.; AYANBULE, K.; SALZBERG, S. L. Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, p. 1–12, 2007.

KLADWANG, W.; CHOU, F.; DAS, R. Automated RNA structure prediction uncovers a missing link in double glycine riboswitches. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 3, p. 1404–1407,

2011.

KLEIN, G.; RAINA, S. Small regulatory bacterial RNAs regulating the envelope stress response. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 417–425, 2017.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27–35, 1 mar. 2000.

KLITGAARD, K. et al. Transcriptional portrait of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during acute disease - potential strategies for survival and persistence in the host. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 709–742, 2001.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.

KWENDA, S. et al. Discovery and profiling of small RNAs responsive to stress conditions in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. **BMC Genomics**, v. 17, 2016.

LAI, D.; MEYER, I. M. A comprehensive comparison of general RNA–RNA interaction prediction methods. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 7, p. e61–e61, 20 abr. 2016.

LALAOUNA, D. et al. Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 6–7, p. 742–747, 2013.

LAVI-ITZKOVITZ, A. et al. Quantitative effect of target translation on small RNA efficacy reveals a novel mode of interaction. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 19, p. 12200–12211, 2014.

LEWIS, D. A.; MITJÀ, O. *Haemophilus ducreyi*: From sexually transmitted infection to skin ulcer pathogen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 1, p. 52–57, 2016.

LI, L. et al. Changes in gene expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in response to anaerobic stress reveal induction of central metabolism and biofilm formation. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 473–481, jun. 2014.

LI, Y. et al. A TolC-Like protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is involved in antibiotic resistance and biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 07, 24 out. 2016.

LINHARTOVÁ, I. et al. RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1076–1112, 2010.

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521–527, nov. 2011.

LONGHI, D. A. et al. Microbial growth models: A general mathematical approach to obtain μ_{max} and λ parameters from sigmoidal empirical primary models. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 369–375, 2017.

LORENZ, R. et al. ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 6, n. 1, p. 26, 2011.

LOTT, S. C. et al. GLASSgo – Automated and reliable detection of sRNA homologs from a single input sequence. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. April, p. 1–12, 17 abr. 2018.

MAAS, A. et al. Use of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiple mutant as a vaccine that allows differentiation of vaccinated and infected animals. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 4124–4132, 2006.

MAKI, K. et al. A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of ptsG mRNA. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 782–792, 2010.

MANDAL, M. et al. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. **Science**, v. 306, n. 5694, p. 275–279, 2004.

MANN, M.; WRIGHT, P. R.; BACKOFEN, R. IntaRNA 2.0: Enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W435–W439, 2017.

MCARTHUR, S. D.; PULVERMACHER, S. C.; STAUFFER, G. V. The *Yersinia pestis* gcvB gene encodes two small regulatory RNA molecules. **BMC microbiology**, v. 6, p. 52, 2006.

- MÉGROZ, M. et al. The RNA-binding chaperone Hfq is an important global regulator of gene expression in *Pasteurella multocida* and plays a crucial role in production of a number of virulence factors, including hyaluronic acid capsule. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1361–1370, 2016.
- MELAMED, S. et al. Global mapping of small RNA-target interactions in bacteria. **Molecular Cell**, v. 63, n. 5, p. 884–897, 2016.
- MERIALDI, G. et al. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 234–239, 2012.
- MEYNS, T. et al. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 187, n. 3, p. 388–392, 2011.
- MICHAUX, C. et al. Involvement of *Enterococcus faecalis* small RNAs in stress response and virulence. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3599–3611, 2014a.
- MICHAUX, C. et al. Physiological roles of small RNA molecules. **Microbiology**, v. 160, n. Pt_6, p. 1007–1019, 2014b.
- MIYAKOSHI, M.; CHAO, Y.; VOGEL, J. Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA. **The EMBO journal**, v. 34, n. 11, p. 1478–1492, 2015.
- MONTEIRO, C. et al. Hfq and Hfq-dependent small RNAs are major contributors to multicellular development in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **RNA biology**, v. 9, n. 4, p. 489–502, 2012.
- MOON, K.; GOTTESMAN, S. Competition among Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1545–1562, 2011.
- MŔAZEK, J.; XIE, S. Pattern locator: A new tool for finding local sequence patterns in genomic DNA sequences. **Bioinformatics**, v. 22, n. 24, p. 3099–3100, 2006.
- NADELL, C. D. et al. Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. **The ISME Journal**, v. 9, n. 8, p. 1700–1709, 2015.
- NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Computational identification of functional RNA homologs in metagenomic data. **RNA Biology**, v. 10, n. 7, p. 1170–1179, 27 jul. 2013b.
- NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2933–2935, 2013a.
- NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. 1. ed. New York, NY: Oxford University Press, 2000.
- NETER, E. et al. The effects of antibiotics on enterobacterial lipopolysaccharides (endotoxins), hemagglutination and hemolysis. **The Journal of Immunology**, v. 80, n. 1, p. 66–72, 1958.
- NIVEN, D. F.; LEVESQUE, M. V-factor-dependent growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 (Bertschinger 2008/76). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 3, p. 319–320, 1988.
- O’NEILL, C. et al. Population-based analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIVA for use as a DIVA antigen. **Vaccine**, v. 28, n. 31, p. 4871–4874, 2010.
- O’TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 47, p. 10–11, 2011.
- OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877–886, 2015.
- PAPENFORT, K. et al. Evidence for an autonomous 5’ target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 47, p. 20435–40, 2010.
- PAPENFORT, K.; VANDERPOOL, C. K. Target activation by regulatory RNAs in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 2015.
- PAPENFORT, K.; VOGEL, J. Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 278–287, 2009.
- PAPENFORT, K.; VOGEL, J. Small RNA functions in carbon metabolism and virulence of enteric

- pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, n. July, p. 91, 2014.
- PEER, A.; MARGALIT, H. Evolutionary patterns of *Escherichia coli* small RNAs and their regulatory interactions Evolutionary patterns of *Escherichia coli* small RNAs and their regulatory interactions. **Rna**, v. 2014, p. 1–11, 2014.
- PEREIRA, M. F. et al. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161, n. Pt_2, p. 387–400, 2014.
- PÉREZ-REYTOR, D. et al. Role of non-coding regulatory RNA in the virulence of human pathogenic vibrios. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–13, 11 jan. 2017.
- PERNI, S.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. **Food Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 491–495, dez. 2005.
- PORCHERON, G.; DOZOIS, C. M. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1–2, p. 2–14, 2015.
- PULVERMACHER, S. C.; STAUFFER, L. T.; STAUFFER, G. V. Role of the *Escherichia coli* Hfq protein in GcvB regulation of oppA and dppA mRNAs. **Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 115–123, 2009.
- PULVERMACHER, S. C.; STAUFFER, L. T.; STAUFFER, G. V. The role of the small regulatory RNA GcvB in GcvB/mRNA posttranscriptional regulation of oppA and dppA in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 281, n. 1, p. 42–50, 2008.
- RAMJEET, M. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 9, n. 1, p. 25–45, 2008.
- RAMOS, C. G. et al. MtvR is a global small noncoding regulatory RNA in *Burkholderia cenocepacia*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 16, p. 3514–3523, 2013.
- REGULSKI, E. E. et al. A widespread riboswitch candidate that controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 918–932, 2008.
- REPOILA, F.; DARFEUILLE, F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. **Biology of the Cell**, v. 101, n. 2, p. 117–131, 2009.
- RICHTER, A. S.; BACKOFEN, R. Accessibility and conservation: General features of bacterial small RNA-mRNA interactions? **RNA Biology**, v. 9, n. 7, p. 954–965, 2012.
- RIVALS, I. et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401–407, 2007.
- RODIONOV, D. A. et al. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48949–48959, 2002.
- ROSSI, C. C. et al. A computational strategy for the search of regulatory small RNAs in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **RNA**, v. 22, n. 9, p. 1373–1385, set. 2016.
- ROSSI, C. C. et al. Face to face with *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Landscape of the distribution of clinical isolates in Southeastern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 23, p. 2916–2924, 2013.
- ROSSI, C. C. **Identification of small regulatory RNAs and development of a molecular marker for the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae***. (Tese) Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- RYAN, D.; MUKHERJEE, M.; SUAR, M. The expanding targetome of small RNAs in *Salmonella* Typhimurium. **Biochimie**, 2017.
- SADILKOVA, L. et al. Type IV fimbrial subunit protein ApfA contributes to protection against porcine pleuropneumonia. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 2, 2012.
- SANTANA, E. A. et al. HrrF is the fur-regulated small RNA in nontypeable *Haemophilus influenzae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105644, 26 ago. 2014.
- SÁRKÖZI, R.; MAKRAI, L.; FODOR, L. Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 16. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 4, p. 444–450, dez. 2015.

- SASSU, E. L. et al. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae* -knowledge, gaps and challenges. **Transboundary and Emerging Diseases**, n. February, p. 1–19, 30 out. 2017.
- SATYAVATHI, V. V.; MINZ, A.; NAGARAJU, J. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 8, p. 1753–1763, 2014.
- SAUER, E. Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. **RNA biology**, v. 10, n. 4, p. 610–8, 2013.
- SAUER, E.; WEICHENRIEDER, O. Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p. 13065–13070, 2011.
- SERGANOV, A. et al. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1167–1171, 2006.
- SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R. Post-genomic vaccine development. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2985–2992, 2006.
- SHAO, Y. et al. Functional determinants of the quorum-sensing non-coding RNAs and their roles in target regulation. **The EMBO journal**, v. 32, n. 15, p. 2158–2171, 2013.
- SHARMA, C. M. et al. A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. **Genes and Development**, v. 21, p. 2804–2817, 2007.
- SHARMA, C. M. et al. Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. **Molecular Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1144–1165, 2011.
- SHIN, S. Y.; KANG, J. H.; HAHM, K.-S. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. **Journal of Peptide Research**, v. 53, n. 1, p. 82–90, jan. 1999.
- SILVA, T. F. DA. **Caracterização e expressão da chaperona Hfq em *Actinobacillus pleuropneumoniae*, o agente causal da pleuropneumonia suína.** (Dissertação) Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- SMIRNOV, A. et al. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 41, p. 11591–11596, 11 out. 2016.
- SONG, T. et al. *Vibrio cholerae* utilizes direct sRNA regulation in expression of a biofilm matrix protein. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 2014.
- STERZENBACH, T. et al. A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella* Typhimurium. **The EMBO journal**, v. 32, n. 21, p. 2872–83, 2013.
- STORZ, G.; VOGEL, J.; WASSARMAN, K. M. Regulation by small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. **Molecular Cell**, v. 43, n. 6, p. 880–891, set. 2011.
- SUBASHCHANDRABOSE, S. et al. The RNA chaperone Hfq promotes fitness of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during porcine pleuropneumonia. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 8, p. 2952–2961, 2013.
- SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 2017.
- TEALE, C.; MARTIN, P.; WATKINS, G. **VLA ANTIMICROBIAL SENSITIVITY REPORT.** Norwich, UK: 44. 2004.
- THOMASON, M. K. et al. A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 17–35, abr. 2012.
- TONPITAK, W. et al. Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7120–7125, 1 dez. 2002.
- TREMBLAY, Y. D. et al. Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 213, 2013.

- TREMBLAY, Y. D. N.; DESLANDES, V.; JACQUES, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes expression in biofilms cultured under static conditions and in a drip-flow apparatus. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 364, 2013.
- TROXELL, B.; HASSAN, H. M. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. October, p. 1–13, 2013.
- UMU, S. U.; GARDNER, P. P. A comprehensive benchmark of RNA-RNA interaction prediction tools for all domains of life. **Bioinformatics**, v. 33, n. 7, p. 988–996, 2017.
- URBAN, J. H.; VOGEL, J. Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation. **PLoS Biology**, v. 6, n. 3, p. 0631–0642, 2008.
- URBANOWSKI, M. L.; STAUFFER, L. T.; STAUFFER, G. V. The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 856–868, 2000.
- VANDERPOOL, C. K.; BOBROVSKYY, M.; RICHARDS, G. R. Small RNAs regulate primary and secondary metabolism in Gram-negative bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–26, 25 jun. 2015.
- VINCENT, H. A. et al. Characterization of *Vibrio cholerae* Hfq provides novel insights into the role of the Hfq C-terminal region. **Journal of molecular biology**, v. 420, n. 1–2, p. 56–69, 29 jun. 2012.
- VOGEL, J.; LUISI, B. F. Hfq and its constellation of RNA. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 578–589, 2011.
- VOGEL, J.; WAGNER, E. G. H. Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 262–270, 2007.
- WASSARMAN, K. M. 6S RNA: a regulator of transcription. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1425–1431, set. 2007.
- WATERS, L. S.; STORZ, G. Regulatory RNAs in Bacteria. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 615–628, fev. 2009.
- WATT, A. E. et al. A novel *Glaesserella* sp. isolated from pigs with severe respiratory infections has a mosaic genome with virulence factors putatively acquired by horizontal transfer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 11, 2018.
- WEIGEL, W. A.; DEMUTH, D. R. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in Enterobacteriaceae and Pasteurellaceae. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 379–397, 2016.
- WRIGHT, P. R. et al. Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 37, p. E3487–E3496, 2013.
- WRIGHT, P. R. et al. CopraRNA and IntaRNA: Predicting small RNA targets, networks and interaction domains. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, 2014.
- WRIGHT, P. R.; GEORG, J. Workflow for a Computational Analysis of an sRNA Candidate in Bacteria. In: ARLUISON, V.; VALVERDE, C. (Eds.). **Bacterial Regulatory RNA: Methods and Protocols**. Hatfield: Humana Press, 2018. p. 3–30.
- XIE, F. et al. The Lon protease homologue LonA, not LonC, contributes to the stress tolerance and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 93, p. 38–43, 2016.
- XU, Z. et al. Comparative genomic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 21, p. 5625–5636, 2010.
- ZHOU, Y. et al. Adhesion protein ApfA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is required for pathogenesis and is a potential target for vaccine development. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 2, p. 287–294, 2013.
- ZHU, Q.; KOSOY, M.; DITTMAR, K. HGTector: An automated method facilitating genome-wide discovery of putative horizontal gene transfers. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.
- ZHU, Z. et al. Polyamine-binding protein PotD2 is required for stress tolerance and virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 12, p. 1647–1657, 2017.

MATERIAL SUPLEMENTAR

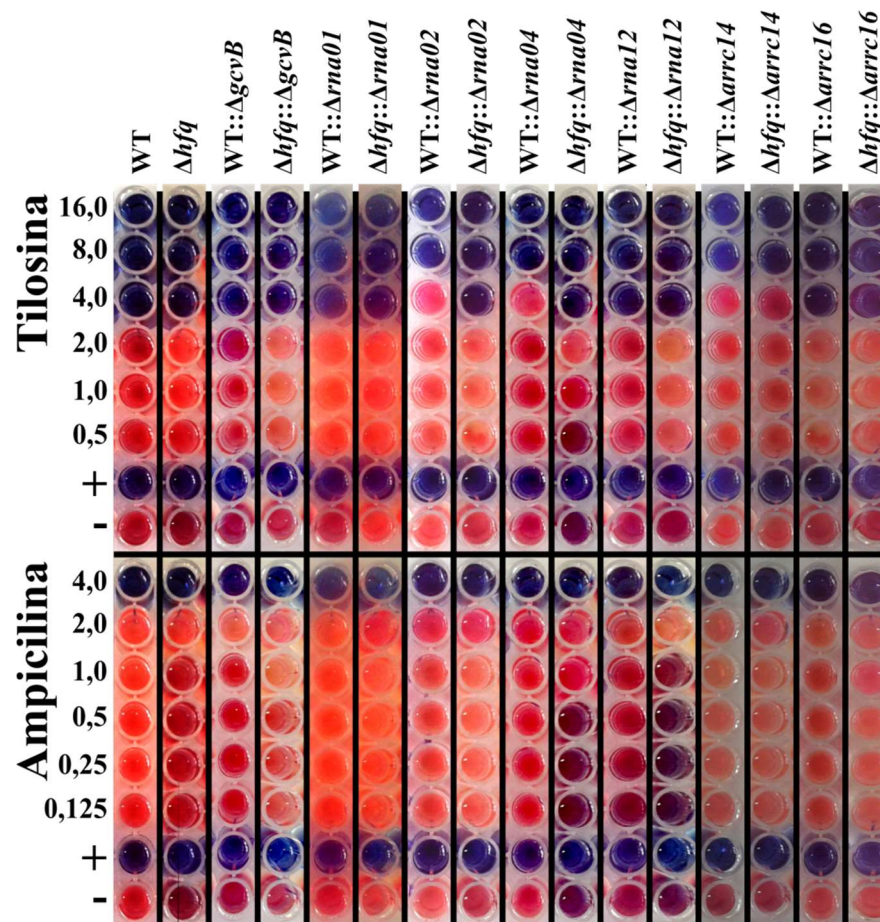


Figura S1. Determinação da CIM para linhagens parentais e Δ sRNA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica com três repetições experimentais cada. A coloração rosa/avermelhada indica redução do composto resazurina em função de atividade biológica. O valor de CIM foi considerado como sendo a menor diluição onde não ocorreu mudança da coloração azul. O controle positivo foi realizado com incubação do antibiótico Florfenicol na concentração de 4 μ g/mL e o controle negativo foi realizado em meio BHI-NAD sem adição de antibióticos.

Tabela S1. Concentração inibitória mínima das linhagens de App parentais e Δ sRNAs

Linhagem	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	Ampicilina	Tilosina
WT	4	4
Δhfq	4	4
WT_ $\Delta gcvB$	4	4
Δhfq_gcvB	4	4
WT_ $\Delta rna01$	4	4
Δhfq_rna01	4	4
WT_ $\Delta rna02$	4	8
Δhfq_rna02	4	4
WT_ $\Delta rna04$	4	8
Δhfq_rna04	4	4
WT_ $\Delta arrc14$	4	8
Δhfq_arrc14	4	8
WT_ $\Delta arrc16$	4	4
Δhfq_arrc16	4	4

Pontos de corte ($\mu\text{g/mL}$): Ampicilina: $\leq 0,5$ – Sensível; 1,0 – Intermediário; $\geq 2,0$ – Resistente.
Tilosina: $\geq 32,0$ – Resistente.

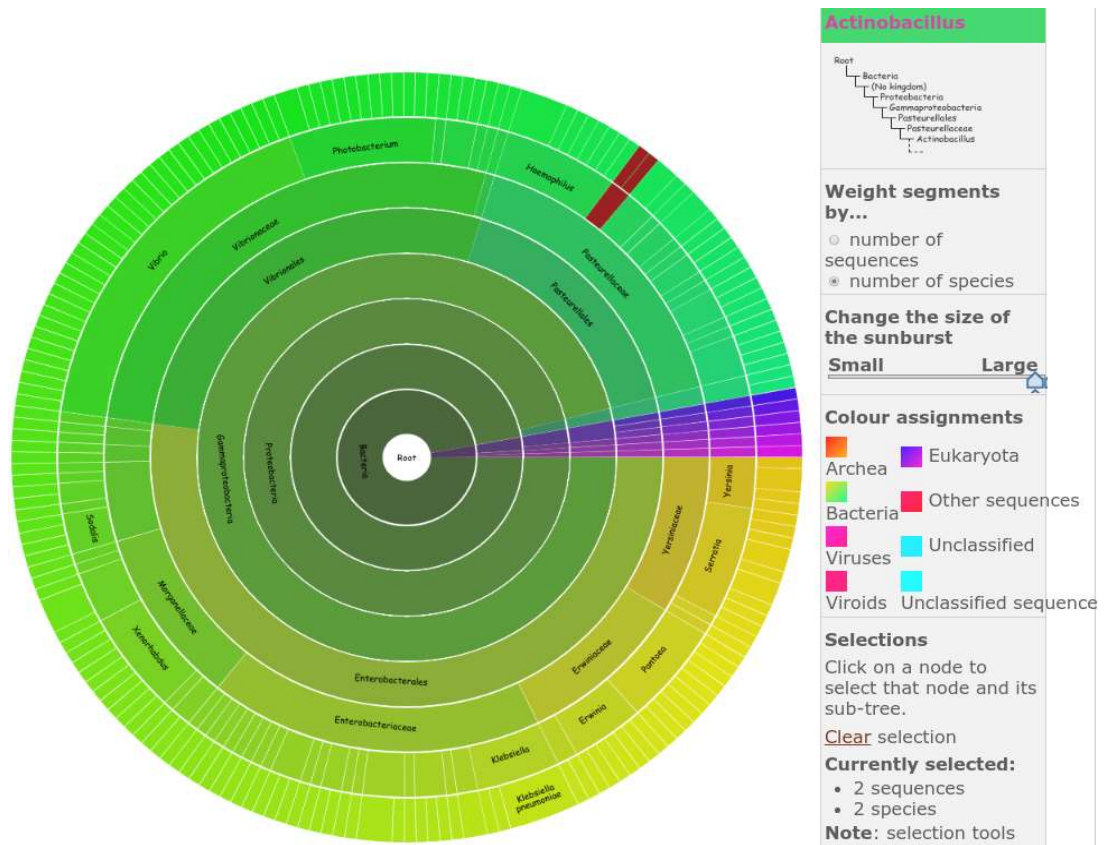


Figura S2. Distribuição do sRNA GcvB.
<http://rfam.xfam.org/family/RF00022#tabview=tab4>

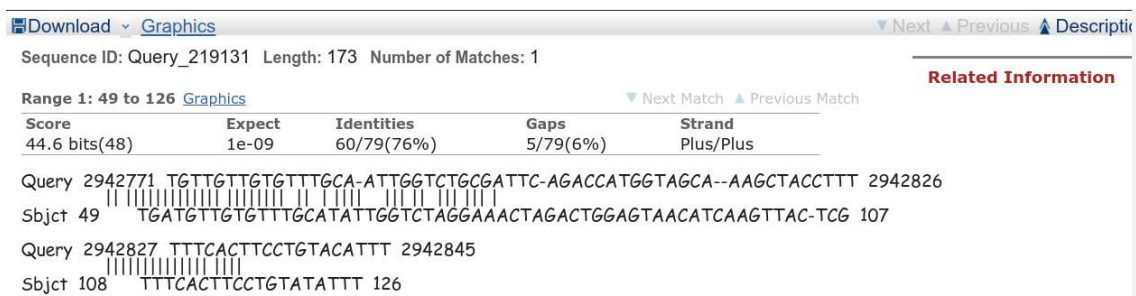


Figura S3. BLASTn da sequência de GcvB de *Escherichia coli* K12 (Query) contra GcvB de *Actinobacillus pleuropneumoniae* MIDG2331 (sbjct).

5'AGTTTCCGAATTATTACGGTAAATTCAGCTATTTTCAGATTTTAAAGTAT
 GATGTTGTGTTTGCATATTGGTCTAGGAACTAGACTGGAGTAACAT
 CAAGTTACTCGTTTCACTTCTGTATATTTTAAACCTTTTTGGTTTATA
 ACCGTCCATTTTGGACGGTTTTTTTCGT3'

Figura S4. Sequência de GcvB de App MIDG2331. As sequências ressaltadas em caixa cinza correspondem às regiões 1 e 2, conservadas entre os homólogos e que são idênticas às regiões conservadas identificadas para os homólogos de GcvB depositados no banco de dados Rfam.