

JÉSSICA NOGUEIRA ROSA

**ANÁLISE FUNCIONAL DO RNA PEQUENO Rna01 NA VIRULÊNCIA DE
*Actinobacillus pleuropneumoniae***

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

Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli

Coorientadores: Eduardo de Almeida Marques da Silva
Hilário Cuquetto Mantovani

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R788a Rosa, Jéssica Nogueira, 1994-
2019 Análise funcional de RNA pequeno Rna01 na virulência de
Actinobacillus pleuropneumoniae / Jéssica Nogueira Rosa. - Viçosa,
MG, 2019.
74 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Denise Mara Soares Bazzolli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.61-71.

1. Pleuropneumonia suína - Vacina. 2. RNA. 3. Regulação da
expressão gênica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.34

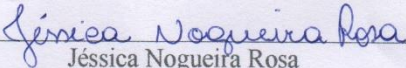
JÉSSICA NOGUEIRA ROSA

**ANÁLISE FUNCIONAL DO RNA PEQUENO Rna01 NA VIRULÊNCIA DE
*Actinobacillus pleuropneumoniae***

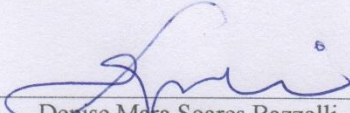
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2019

Assentimento:



Jéssica Nogueira Rosa
Autora



Denise Mara Soares Bazzolli
Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Às agências de fomento FAPEMIG, CAPES, CNPq, que financiaram a pesquisa aqui apresentada.

Agradeço aos meus pais, Margareth e Célio, por acreditar e sonhar junto comigo a realização do mestrado. Por acreditar que um dia eu chegaria aqui e poderia ir além.

Agradeço a minha equipe de pesquisa, minha segunda família. Minha orientadora, Denise Mara Soares Bazzolli, pelas broncas dadas quando precisava (e quando não precisava). Como você sempre diz: “olha o quanto você cresceu e aprendeu nesses últimos anos!”, sim, e obrigada por isso!

Agradeço ao professor Antônio Galvão do Nascimento, pela ajuda com as curvas de crescimento e seus ensinamentos sobre como a vida é bela e a fisiologia é linda (pode até ser linda, mas é difícil viu!). Obrigada pela curva de crescimento pessoal (meu) e bacteriano!

Agradeço ao professor Eduardo de Almeida Marques da Silva, por me ensinar e ajudar com análises de imunologia essenciais para este trabalho. Agradeço a você, Adriana, Sabrina, Ingrid e Daniel por me incentivarem durante as análises e principalmente, no dia em que eu perdi a garrafinha com os macrófagos (foi muito triste). LIP, vocês são incríveis!

Agradeço aos professores Gustavo Ferreira Martins (pela ajuda com *G. mellonella*), Poliane Alfnas Zerbini (por me incentivar sempre e ajudar com o preparo das amostras de EVs), Leandro Licursi de Oliveira (pela ajuda com os testes de citocinas) e Cláudio Lisias Mafra de Siqueira (por ceder o laboratório para alguns experimentos).

Agradeço ao Newton Moreno Sanches (Newtinho), por todas as lições aprendidas no curto tempo que fiquei ao seu lado. Você sempre terá um espaço no meu coração (pequeninja).

Agradeço ao Giarlã, por ter me ajudado e ensinado tudo dentro do laboratório de genética molecular de bactérias (ao som de Bonde do forró – vol. 10). Obrigada por tudo!

Agradeço ao Paulo, Matheus, Fábio, Patrícia, João e Dâmaris, por me ajudar durante o mestrado (nos momentos de euforia e desespero). Vocês são muito importantes!

Agradeço ao Jonas (xonas), por me auxiliar no preparo das Grids. Obrigada!

Agradeço ao Tomás, por me ajudar com estatística. Obrigada!

Agradeço aos técnicos José Carlos, Emília, Raquel e Michele, por me ajudar sempre que eu chegava desesperada por conta de algum equipamento!

Agradeço aos meus amigos nessa caminhada: Osiel, Mirele, Marlon, Adriele e outros (perdoe se eu não citei o nome de todos). Minha caminhada seria muito mais difícil sem vocês!

Agradeço ao Núcleo de Estudos em Microbiologia Agrícola (NEMA), por todas as boas experiências incríveis que me possibilitaram levar o conhecimento de microbiologia ao público! Vocês fazem um ótimo trabalho!

Agradeço a todos os meus professores, desde o jardim de infância até o mestrado! Vocês são parte do caminho que trilhei. Esse agradecimento, vai com carinho especial a professora Maria Aparecida (por me alfabetizar), Vanderci (por me motivar a ser astronauta, com 10 anos), Alexandre e Flávio (por me inspirar a ser professora).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigada a todos!

RESUMO

ROSA, Jéssica Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Análise funcional do RNA pequeno Rna01 na virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae***. Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli. Coorientadores: Eduardo de Almeida Marques da Silva e Hilário Cuquetto Mantovani.

Actinobacillus pleuropneumoniae (App), o agente causador da pleuropneumonia suína (PPS), é uma bactéria fastidiosa pertencente à família Pasteurellaceae. O estabelecimento da infecção por App envolve a expressão de fatores essenciais para virulência como: exotoxinas, polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos (LPS) e vesículas de membrana externa (OMVs). Os fatores de virulência podem ser regulados por RNAs pequenos reguladores (sRNA). Foram identificados 35 sRNAs em App, o que inclui o sRNA dependente de Hfq denominado Rna01. Análises de alvos para o sRNA01 mostraram RNAs mensageiros relacionados às vias metabólicas centrais e componentes estruturais de membrana. O mutante para o Rna01 mostrou potencial atenuação em análises preliminares com *Galleria mellonella*. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a funcionalidade do RNA pequeno regulador Rna01 na virulência de App e o potencial da linhagem WT_Δrna01 como candidata a vacina viva atenuada. Os resultados obtidos mostraram que a ausência do Rna01 afeta negativamente o crescimento e adesão, reduz a produção de EVs e altera seu perfil proteico. Os testes de sobrevivência com *G. mellonella* mostraram atenuação da linhagem WT_Δrna01 (sobrevivência de 72%) e aumento da melanização das larvas após 48 horas de infecção. Larvas inoculadas com EVs da linhagem WT_Δrna01 apresentaram menor taxa de sobrevivência (50%). Análises em cultura de macrófagos RAW 264.7 mostraram menor taxa de infecção e produção de óxido nítrico (NO) quando infectadas com o mutante WT_Δrna01. Além disso, a quantidade de bactérias internalizadas por macrófagos infectados também foi reduzida. Todavia, as concentrações das citocinas TNF-α e IL-6 foram iguais e/ou maiores, que as encontradas na linhagem selvagem. Deste modo, sugerimos que a linhagem WT_Δrna01 possa induz resposta do tipo Th17 e Th1 *in vitro*. Concluimos que o Rna01 afeta positivamente na virulência de App e a linhagem WT_Δrna01 é uma possível candidata a vacina viva atenuada, mas são necessárias análises complementares.

Palavras-chave: Pleuropneumonia suína. RNAs pequenos reguladores. Citocinas. Vacina viva atenuada

ABSTRACT

ROSA, Jéssica Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Functional analysis of the small RNA Rna01 on the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.** Adviser: Denise Mara Soares Bazzolli. Co-advisers: Eduardo de Almeida Marques da Silva and Hilário Cuquetto Mantovani.

Actinobacillus pleuropneumoniae (App), the causative agent of swine pleuropneumonia (PPS), is a fastidious bacterium belonging to the Pasteurellaceae family. The establishment of App infection involves the expression of essential factors for virulence such as: exotoxins, capsular polysaccharides, lipopolysaccharides (LPS) and outer membrane vesicles (OMVs). Virulence factors can be regulated by small regulatory RNAs (sRNA). Were identified 35 sRNAs in App, which includes the Hfq-dependent sRNA called Rna01. Target analysis for sRNA01 showed messenger RNAs related to central metabolic pathways and structural membrane components. The Rna01 mutant showed the potential attenuation in preliminary analyzes with *Galleria mellonella*. Thus, the aim of this work was to investigate the functionality of the small regulatory RNA01 in App virulence and the potential of the WT_Δrna01 strain as a candidate for live attenuated vaccine. The results obtained showed that the absence of Rna01 negatively affects growth and adhesion, reduces the production of EVs and changes its protein profile. Survival tests with *G. mellonella* showed attenuation of the WT_Δrna01 strain (72% survival) and increased larval melanization after 48 hours of infection. Larvae inoculated with EVs of the WT_Δrna01 strain had a lower survival rate (50%). Culture analyzes of RAW 264.7 macrophages showed a lower infection rate and nitric oxide (NO) production when infected with the WT_Δrna01 mutant. In addition, the amount of bacteria internalized by infected macrophages has also been reduced. However, the concentrations of cytokines TNF-α and IL-6 were the same and/or higher than those found in the wild strain. Thus, we suggest that the strain WT_Δrna01 may induce a Th17 and Th1 type response in vitro. We conclude that Rna01 positively affects the virulence of App and the strain WT_Δrna01 is a possible candidate for live attenuated vaccine, but further analysis is necessary.

Keywords: Porcine pleuropneumonia. Small regulatory RNAs. Cytokines. Live attenuated vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia utilizada para restaurar o fenótipo selvagem da linhagem wt_Δrna01 ..	27
Figura 2: Estratégia de construção do cassete de restauração fenotípica denominado rna01_cat	33
Figura 3: Perfil de crescimento das linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.....	35
Figura 4: Adesão em microplaca de <i>A. pleuropneumoniae</i> pelo método do cristal violeta....	37
Figura 5: Morfologia das EVs produzidas pelas linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01 obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)..	38
Figura 6: Perfil proteico das vesículas extracelulares produzidas pelas linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.....	39
Figura 7: Perfil de proteínas totais obtidas a partir células das linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.....	40
Figura 8: Produção de vesículas extracelulares por linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.	41
Figura 9: Virulência de linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01 no modelo alternativo <i>G. mellonella</i>	42
Figura 10: Ensaio de virulência em <i>G. mellonella</i> com EVs produzidas por linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i>	43
Figura 11: Avaliação da melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas pelas linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.....	45
Figura 12: Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados com linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.....	46
Figura 13: Taxa de macrófagos infectados com linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01	48
Figura 14: Produção das citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos RAW 264.7 infectados com linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vacinas vivas atenuadas contra <i>A. pleuropneumoniae</i> descritas na literatura.	24
Tabela 2: Linhagens bacterianas de <i>A. pleuropneumoniae</i> utilizadas neste trabalho.	26
Tabela 3: Primers utilizados para construção da linhagem $\Delta rna01C$. Região em cinza representa a cauda dos primers onde ocorre sobreposição dos fragmentos.	28
Tabela 4: Valores de velocidade de crescimento específica máxima μ (h^{-1}) e crescimento máximo (valores referentes a DO_{600}) das linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_ $\Delta rna01$, Δhfq e $\Delta hfq_{\Delta rna01}$	36
Tabela 5: Valores de velocidade de crescimento específica máxima comparada entre as linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i> WT, WT_ $\Delta rna01$, Δhfq e $\Delta hfq_{\Delta rna01}$	36
Tabela 6: Valores de <i>p-value</i> obtidos por comparação múltipla entre as linhagens analisadas.	42
Tabela 7: Valores de <i>p-value</i> obtidos por comparação múltipla entre as linhagens (EVs)	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ApfA proteína constituinte da fímbria tipo IV de *A. pleuropneumoniae*

App *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Apx I, II, III e IV Exotoxinas de APP pertencentes à família RTX de proteínas

ArcA Proteína reguladora de resposta citosólica

BHI *Brain Heart Infusion Broth* – Infusão de Coração e cérebro

CoIP Co-imunoprecipitação

CRISPR *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dfrA14 dihidrofolato redutase - gene que codifica resistência à trimetoprim proveniente do plasmídeo pM3389T

DUS DNA uptake system

eric Gene *downstream* ao gene *rna01* proveniente do genoma da linhagem MIDG 2331

EVs Vesículas extracelulares

EOMVs Vesículas explosivas de membrana externa

Hfq Proteína chaperona de RNA

HlyX Regulador global da respiração anaeróbia

H-NS Proteína de associação ao nucleóide – NAP

IgG Imunoglobulina G

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

LAV *Live Vaccine Attenuated*

LPS Lipopolissacarídeos

MET Microscopia eletrônica de transmissão

MO Macrófagos

mRNA RNA mensageiro

NAD Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NAP Proteína de associação ao nucleóide

NO Óxido nítrico

OMPs *Outer-membrane proteins*

OMVs Vesículas de membrana externa

OIMVs Vesículas de membrana externa-interna

PCR-OE *PCR overlapping extension*

PO melanina-fenoxidase

PGA Poli-N-acetilglucosamina

PPS Pleuropneumonia suína

PBS Tampão fosfato salino

ProQ Proteína chaperona de RNA

RTX *Repeats-in-toxin*

sbcB Gene *upstream* ao gene *rna01* proveniente do genoma da linhagem MIDG 2331

SFB Soro fetal bovino

sRna01 RNA Pequeno regulador de App

sRNAs RNA Pequenos reguladores

TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa

Th1 Célula T *helper* 1

VacI Proteína recombinante

WT Linhagem selvagem

WT_ $\Delta rna01$ Linhagem mutante para o gene *rna01* isogênica ao WT

Δhfq Linhagem mutante para o gene *hfq* isogênica ao WT

Δhfq _ $\Delta rna01$ Linhagem duplo mutante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App): agente causador da pleuropneumonia suína (PPS).....	16
2.2	Fatores de virulência em <i>A. pleuropneumoniae</i>	17
2.2.1	Vesículas Extracelulares (EVs) de origem bacteriana	18
2.4	Regulação da expressão gênica por RNAs pequenos reguladores.....	20
2.6	Aspectos imunológicos da PPS.....	22
2.7	Vacinas vivas atenuadas descritas para <i>A. pleuropneumoniae</i>	23
3	HIPÓTESE.....	25
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo geral.....	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	Linhagens bacterianas, condições de crescimento e manutenção.....	26
5.2	Obtenção e confirmação da linhagem Δ<i>rna01C</i>	26
5.3	Determinação da cinética de crescimento de App	28
5.4	Ensaio de adesão em microplaca.....	28
5.5	Extração e purificação de vesículas extracelulares (EVs) produzidas por App.....	29
5.5.1	Determinação de proteínas das EVs por SDS-PAGE	30
5.5.2	Estimativa da produção de EVs pelas linhagens.....	30
5.5.3	Observação da morfologia das EVs por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	30
5.6	Ensaio de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	30

5.6.1	Análise de sobrevivência	30
5.6.2	Avaliação da melanização da hemolinfa das larvas de <i>G. mellonella</i>	31
5.7	Análises em cultura de macrófagos RAW 264.7	31
5.7.1	Determinação da produção de óxido nítrico	31
5.7.2	Determinação da taxa de infecção e do número de bactérias por macrófagos infectados.....	32
5.7.3	Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	32
5.7	Análises estatísticas.....	32
6	RESULTADOS	33
6.1	Construção do cassete de complementação da linhagem App Δ <i>rna01</i> : <i>rna01C_cat</i>	33
6.2	Análise de crescimento	34
6.3	Adesão de App em microplaca.....	36
6.4	Produção, morfologia e conteúdo de EVs produzidas pelas linhagens de <i>A. pleuropneumoniae</i>	37
6.7	Virulência de App em <i>G. mellonella</i>	41
6.8	Melanização da hemolinfa	44
6.9	Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7.....	46
6.10	Taxa de infecção e número de bactérias por macrófagos infectados.....	47
6.11	Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	49
7.	DISCUSSÃO	51
8.	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO A - Cassete obtido por <i>PCR overlapping extension</i> (OE).....	72

1. INTRODUÇÃO

Actinobacillus pleuropneumoniae (App), o agente causador da pleuropneumonia suína (PPS), é uma bactéria fastidiosa pertencente à família Pasteurellaceae, Gram-negativa, anaeróbia facultativa, encapsulada e de morfologia cocobacilar. Atualmente, são descritos 18 sorotipos baseados em antígenos capsulares, sendo os sorotipos 8, 7, 5 e 10 encontrados com maior frequência no estado de Minas Gerais.

Os fatores de virulência associados a App são considerados multifatoriais. Entre eles a produção de cápsula, sideróforos, lipopolissacarídeos (LPS) e toxinas da família RTX são importantes fatores relacionados ao sucesso da infecção. Além disso, vesículas de membrana externa (OMVs) produzidas por App podem influenciar indiretamente no aumento das lesões por este patógeno, sendo um fator importante de virulência.

Mecanismos de regulação pós-transcricionais por RNAs pequenos reguladores (sRNA) estão envolvidos na rápida resposta a alterações ambientais proporcionando adaptação ao meio. Esse mecanismo de regulação constitui o novo paradigma para compreensão da patogênese bacteriana e na interação patógeno-hospedeiro. Em App já foram identificados e confirmados 35 RNAs pequenos regulatórios e entre estes, o RNA pequeno dependente de Hfq denominado Rna01 (identificado por análise de co-immunoprecipitação com a chaperona Hfq e confirmado por *northern blotting*, RT-qPCR e RNAseq). Análises de alvos para o sRNA01 mostraram RNAs mensageiros relacionados às vias metabólicas centrais e componentes estruturais de membrana. Esse sRNA foi encontrado dentro de EVs produzidas por App MIDG 2331 mas seu papel permanece desconhecido. Além disso, a linhagem mutante para o sRNA01 mostrou potencial atenuação em análises preliminares com *Galleria mellonella*, mas são necessários novos testes para confirmação.

A PPS é uma doença respiratória infectocontagiosa comumente encontrada na suinocultura e de significativa importância econômica em escala global. É caracterizada por uma fase aguda onde os sinais clínicos são aumentados, assim como a resposta inflamatória com elevada produção de IL-6, IL-17 e TNF- α . Em sua fase crônica, a produção de anticorpos aumenta assim como a produção de IL-10, diminuindo os sinais clínicos da doença e aumentando a morbidade dos animais infectados.

Com base na complexidade da PPS, atualmente buscam-se estratégias de controle e prevenção da doença, e a produção de vacina viva atenuada é um método em potencial para imunização dos rebanhos. Na literatura, são descritas algumas vacinas vivas atenuadas com elevado potencial imunoprotetor. Contudo, apesar dos resultados positivos, as vacinas atuais

não previnem a colonização e infecção. É desejável que a vacina para PPS ofereça proteção contra colonização e morbidade de forma ampla a todos os sorotipos. Deste modo, este trabalho teve como propósito investigar a funcionalidade do RNA pequeno Rna01 na virulência de App e o potencial da linhagem WT_Δ*rna01* como vacina viva atenuada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App): agente causador da pleuropneumonia suína (PPS)

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, encapsulada e de morfologia cocobacilar com tamanho aproximado de 0,4 x 1,0 µm e pertencente à família Pasteurellaceae, na qual estão presentes diversos patógenos de importância médica e veterinária (FREY, 1995). Os isolados de App são divididos em dois biotipos de acordo com o requerimento de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), entre os quais, o biotipo 1 é β-NAD-dependente e o biótipo 2 β-NAD-independente (NIVEN, LEVESQUE, 1988).

Além disso, App apresenta cápsula polissacarídica e fímbrias do tipo IV, sendo as propriedades antigênicas dos polissacarídeos da cápsula essenciais para classificação dos 18 sorotipos descritos até o presente momento (BOSSÉ et al., 2018). Todos os sorotipos podem causar a pleuropneumonia suína (PPS), uma doença infectocontagiosa que acomete suínos de todas as idades, no entanto, alguns são mais virulentos que outros (FREY, 1995). Existe uma ampla variação dos sorotipos associados aos surtos, podendo o mesmo sorotipo apresentar alta virulência em uma região e baixa em outra (GOTTSCHALK, 2019).

Os sorotipos são distribuídos por diferentes regiões no mundo, sendo 1, 3, 5, 6, 8, 12 e 15 relatados na América do Norte; o sorotipo 2 predominante em países europeus e o sorotipo 8 no Reino Unido, Sudeste do Brasil, Estados Unidos e Canadá (JACQUES, 2004; O'NEILL et al., 2010; LACOUTURE, 2014). No estado de Minas Gerais os sorotipos 8, 7, 5 e 10 são encontrados com maior frequência (COSTA, 2017) justificando a necessidade de estudos voltados a esses sorotipos.

A PPS afeta economicamente o mundo todo pois acarreta perdas significativas na suinocultura (SASSU et al., 2017). Nesse cenário, os produtores brasileiros devem se atentar a essa doença pois o Brasil encontra-se como o quarto país maior produtor de carne suína, com 3.758 milhões de toneladas em 2017, sendo Minas Gerais o quarto estado que mais produziu carne suína no mesmo ano, correspondendo a 11% da produção nacional (ABIPECS, 2018).

Uma característica marcante da PPS é a broncopneumonia necrosante e hemorrágica, com exsudação de fibrina e pleurite (CHIEN et al., 2009). O agravamento da doença tem como consequência lesões no sistema respiratório devidas à produção de toxinas e à inflamação aguda (SASSU et al., 2017). As formas hiperagudas e agudas da PPS podem ser caracterizadas por morte súbita, anorexia, febre e tosse (COELHO et al., 2004). Além disso, a PPS pode se

apresentar em forma crônica, na qual os sinais clínicos são mais brandos, mas afetam a qualidade de vida do animal (COELHO et al., 2004).

Actinobacillus pleuropneumoniae pode ser transmitida via aerossol em curtas distâncias ou por contato direto. Desta forma, coloniza tonsilas e o trato respiratório e adere à membrana das células epiteliais alveolares (LOERA-MURO et al., 2013; ZHOU et al., 2013). A fonte de disseminação pode ser a permanência de animais infectados sem apresentar sinais clínicos ou lesões características, o que explica o grande problema de propagação e a manutenção da infecção nas granjas (DECUADRO-HANSEN et al., 2009).

2.2 Fatores de virulência em *A. pleuropneumoniae*

Após o contato inicial com o hospedeiro, ocorrem modificações na regulação da expressão gênica de proteínas do patógeno importante a virulência que o permite colonizar e persistir nos tecidos do hospedeiro (KUSMIEREK; DERSCH, 2018). Diversos fatores de virulência têm sido atribuídos a App. Entre eles podemos citar: fatores associados à adesão; aquisição de nutrientes (sideróforos); produção de exotoxinas da família RTX, que induz a lesões pulmonares no hospedeiro; evasão do sistema imunológico e persistência (BOSSÉ et al., 2002; CHIERS et al., 2010).

A adesão é parte do estágio inicial do contato de App com o trato respiratório inferior do hospedeiro e muitos genes relacionados a virulência são regulados de forma positiva. O contato de App com células epiteliais *in vitro* e *in vivo* resulta na expressão dos genes do operon *apfABCD*, responsáveis por codificar fímbrias do tipo IV, sugerindo seu papel na adesão (BOEKEMA et al., 2004). Uma vez aderidas, essas células podem iniciar o primeiro estágio de formação de biofilmes (LABRIE et al., 2010). Genes relacionados a formação de biofilme são expressos permitindo à adesão às superfícies, uma característica presente em todos sorotipos de App, sendo um processo essencial para colonização *in vivo* (LABRIE et al., 2010). Poli-N-acetilglucosamina (PGA) é um importante componente da matriz exopolissacarídica de App, sendo uma importante adesina de biofilme (IZANO et al., 2007). Além disso, a proteína H-NS (proteína de associação ao nucleóide - NAP) também está envolvida na virulência e formação de biofilme, atuando como uma proteína reguladora da expressão de genes envolvidos à adesão (DALAI et al., 2009). Outros componentes estão relacionados ao processo de adesão, como lipopolissacarídeos (LPS), que participa da adesão ao muco e aos anéis traqueais de suínos (BÉLANGER et al., 1994); proteínas de membrana externa que auxiliam a colonização de células de tecidos alveolares; e autotransportados que influenciam na formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas (TEGETMEYER et al., 2009).

Uma vez aderida ao trato respiratório inferior, App passa por limitações nutricionais que são contornadas pela ativação de outros fatores de virulência (CHIERS et al., 2010). Muitos genes *up*-regulados participam de processos como aquisição de ferro por meio de produção de sideróforos (SHAKARJI et al., 2006). Além disso, proteínas transportadoras de maltose são sintetizadas (SHAKARJI et al., 2006) e genes para captação de níquel e cobalto são ativados (BOSSÉ et al., 2002).

No decorrer da infecção, as lesões são geradas pela liberação de exotoxinas da família RTX (*Repeats-in-toxin*) e lipopolissacarídeos (SASSU et al., 2017). As toxinas da família RTX (ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV) são produzidas pelos diferentes sorotipos de App, e possuem atividade hemolítica e/ou citotóxica direcionada a macrófagos, neutrófilos, hemácias e células epiteliais alveolares (FREY, 2011). A exotoxina ApxI possui forte atividade hemolítica e citotóxica. ApxII possui fraca atividade hemolítica e moderada atividade citotóxica. ApxIII não possui atividade hemolítica e possui forte atividade citotóxica. ApxIV é produzida por todos os sorotipos, porém, sua participação na virulência não é totalmente compreendida (SHALLER et al., 1999). O LPS potencializa os efeitos das toxinas Apx em fagócitos e estimula a produção de citocinas inflamatórias e induzem necrose em tecidos pulmonares via receptores *Toll-like* (AUGER et al., 2009).

As lesões geradas pela colonização de App alteram as condições iniciais de oxigenação dos tecidos, o que de forma indireta afeta o crescimento da bactéria. Desta forma, para persistir a infecção, há expressão de um gene regulador global (*hlyX*) que ativa produção de enzimas da respiração anaeróbica, como, proteínas de ligação à hemoglobina e dimetilsulfóxido redutase (JACOBSEN et al., 2005). O regulador da resposta citosólica, a proteína ArcA também facilita a adaptação metabólica à anaerobiose e auxilia na formação de biofilmes (BUETTNER et al., 2008).

A virulência de App é considerada multifatorial, variando de acordo com estágios da doença e os sorotipos (MONALESSA et al., 2018). Muitos estudos buscam compreender a complexa regulação dos fatores de virulência em App em busca de desenvolver um método eficaz para o controle da PPS. Recentemente foi descrito para App que a produção de vesículas extracelulares (EVs) é potencial fator de virulência.

2.2.1 Vesículas Extracelulares (EVs) de origem bacteriana

A produção de vesículas extracelulares (EVs) é um processo celular altamente conservado encontrado em todos os três domínios da vida (SCHATZ; VARDI, 2018). Em bactérias a estrutura das EVs varia de acordo com o conteúdo do envelope celular e o seu

conteúdo interno e externo, o que possibilita classificá-las (TOYOFUKU, NOMURA e EBERL, 2019).

Vesículas extracelulares produzidas por bactérias Gram-negativas, por exemplo, são classificadas em três tipos: vesículas de membrana externa (OMVs), vesículas de membrana externa-interna (OIMVs) e vesículas explosivas de membrana externa (EOMVs) (TOYOFUKU, NOMURA e EBERL, 2019). As OMVs são formadas por brotamento da membrana externa (OM) contendo LPS e componentes do periplasma (GILL et al., 2018). São formadas em resposta a distúrbios no envelope celular como o desequilíbrio na biossíntese de peptidoglicano e até mesmo pela presença de moléculas hidrofóbicas na membrana externa (TOYOFUKU, NOMURA e EBERL, 2019). As OIMV e EOMV são produzidas como consequência da lise celular. Ambas as vesículas possuem componentes citoplasmáticos como conteúdo. No entanto, as OIMV possuem membrana externa e interna e as EOMV apenas membrana interna (PÉREZ-CRUZ et al., 2015; TOYOFUKU, NOMURA e EBERL, 2019). Para bactérias Gram-positivas as EVs são classificadas como vesículas de membrana citoplasmática (CMVs) e são produzidas durante a morte celular (TOYOFUKU, NOMURA e EBERL, 2019).

As EVs são estruturas irregulares de tamanho heterogêneo que variam de 20 a 500 nm e são secretadas sob diferentes condições de estresse como na presença de antibióticos (DEVOS et al., 2017). Além disso, seu tamanho e conteúdo variam de acordo com o estado fisiológico das células (DAUROS SINGORENKO et al., 2017). Vesículas extracelulares têm importante função na interação célula-célula e podem transportar DNA, RNA, proteínas e lipídios (GILL et al., 2018). Podem ser relacionadas nos processos de comunicação inter e intracelulares, transferência horizontal de genes (HTG), resistência a antibióticos e modulação da resposta imune do hospedeiro (JAN, 2017).

A produção de OMVs por bactérias Gram-negativas é considerada um fator de virulência em importantes patógenos bacterianos como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* e recentemente para Apx (LAPPANN et al., 2013; ANTENUCCI et al., 2018).

O primeiro relato de EVs produzidas por Apx foi descrito por Negrete-Abascal et al (2000), os autores identificaram que essas EVs apresentam proteases e toxinas Apx. Outros trabalhos mostraram que a utilização de OMVs combinadas com proteínas recombinantes ApxA e VacJ administradas em suínos como uma estratégia de vacinação resultou em aumento na produção de IgG. Por outro lado, houve agravamento das lesões dos tecidos pulmonares (ANTENUCCI et al., 2018). Assim, OMVs são capazes de induzir respostas específicas no

hospedeiro que potencializam a patogenicidade de App, inclusive de forma independente da presença da célula bacteriana (ANTENUCCI et al., 2018).

Nesse contexto, Silva (2018) encontrou diversos sRNAs pequenos, identificados por Rossi (2015), em EVs de App MIDG 2331, sendo, portanto, o primeiro relato da presença de sRNAs em EVs de App. Neste trabalho, o autor questiona o possível papel desses RNAs pequenos durante o desenvolvimento da doença em suínos, visto que, OMVs são importantes mediadoras de interação célula-célula e são capazes de ativar resposta imune no hospedeiro e carrear moléculas como RNAs pequenos reguladores.

2.4 Regulação da expressão gênica por RNAs pequenos reguladores

A regulação da expressão gênica em bactérias ocorre em vários níveis onde, compactação do DNA e mecanismos envolvidos durante e após a transcrição são as principais formas de regulação. Atualmente, com novas tecnologias de sequenciamento e ferramentas de bioinformática é possível compreender as modulações no transcriptoma e na regulação da expressão gênica atribuídas aos RNAs pequenos reguladores ou *small RNAs* (sRNAs) (WATERS et al., 2016). Há um número expressivo de sRNAs relatados em bactérias, com tamanhos que variam de 50 a 500 nucleotídeos (KWENDA et al., 2016) podendo atuar de forma independente ou auxiliados por proteínas chaperonas de RNA, como Hfq e ProQ (STORZ et al., 2011; SMIRNOV et al., 2017). Uma vez que alterações no habitat onde a bactéria se encontra exigem respostas rápidas, muitos desses sRNAs regulam a tradução de mRNAs envolvidos em processos fisiológicos como utilização de fontes de carbono, aminoácidos e íons metálicos (PAPENFORT, VOLGEL, 2014), assim como, transferência horizontal de genes (PAPENFORT et al., 2015), formação de biofilmes, expressão de genes de virulência (CHAO, VOGEL, 2010; JAN, 2017), resposta ao estresse e outros. Além disso, sRNAs em bactérias patogênicas podem modular a expressão gênica de seu hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento da doença (NUSS et al., 2017).

Os sRNAs em bactérias podem ser classificados como RNAs “*cis-acting*”, RNAs “*trans-acting*”, CRISPR (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeats*) e RNAs que modulam a atividade proteica (STORZ et al., 2011). Os sRNAs “*cis-acting*” são transcritos a partir da fita oposta ao seu RNA alvo e, desta forma, possuem complementaridade ao seu alvo. Os sRNAs “*trans-acting*” são codificados em regiões diferentes do seu alvo, e geralmente complementam-se parcialmente a ele. CRISPR é um sistema que participa da resistência a bacteriófagos e os sRNAs moduladores interagem com domínios específicos de proteínas afetando sua atividade (MELAMED et al., 2016).

A interação dos sRNAs com seus alvos ocorre por dois mecanismos de ação: i) interação com proteínas e ii) pareamento completo ou parcial com mRNA cognatos (STORZ et al., 2011). Pelo fato dos sRNAs “*trans-acting*” serem codificados em regiões diferentes de seus alvos, possuem uma gama maior de mRNAs ligantes e muitos deles necessitam de associação com proteínas chaperonas como Hfq e ProQ que estabilizam a interação ou marcam os mRNAs para degradação (WAGNER; ROMBY, 2015; SMIRNOV et al., 2017).

Em App sorotipo cinco, 23 sRNAs foram identificados *in silico* e confirmados por Rossi et al. (2016), divididos em categorias como *housekeeping*, sRNAs que modulam atividade proteica, “*cis-acting*” e “*trans-acting*”, com funções no metabolismo de aminoácidos e sistema de transporte de ferro. Outros sRNAs também foram identificados para App MIDG 2331 por co-imunoprecipitação (CoIP/ Hfq) em condições de anaerobiose e aerobiose, onde 12 sRNAs foram identificados e alguns de seus mRNAs alvos são importantes para virulência e resposta a diferentes condições de estresse (ROSSI, 2015). Dada a importância dos sRNAs para regulação do metabolismo, muitos trabalhos precisam ser feitos para compreender a complexa rede regulatória mediada por sRNAs em App.

Um importante sRNA, identificado e confirmado em App MIDG 2331 (sorotipo 8), foi obtido por co-imunoprecipitação (coIP/Hfq) usando a proteína marcada Hfq::3XFlag em condições de aerobiose e anaerobiose, e posteriormente confirmado por sequenciamento, *Northern blotting* e RTq-PCR (ROSSI, 2015). Esse sRNA, denominado Rna01, apresenta 86 nucleotídeos orientados sob a fita negativa e flanqueado pelos genes *sbcB* (*upstream*) e *eriC* (*downstream*). Pertence à classe dos “*trans-acting*” e depende da proteína Hfq tanto em aerobiose quanto em anaerobiose como mostram os resultados de *Northern blotting* em Rossi (2015). Esse pequeno RNA apresenta homólogos nas famílias Bacillaceae e Mycoplasmataceae, além de um homólogo pertencente a um fago da família Siphoviridae, gênero Lambdavirus descrito em *Mannheimia* phage vB_Mhs_535AP2. Dentro da família Pasteurellaceae, os homólogos são *Haemophilus ducreyi*, *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus suis*, *Bibersteinia trehalosi*, *Glaesserella parasuis*, *Mannheimia varigena* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (SANCHES, 2018).

Para determinar alvos e funções regulatórias dos sRNAs é necessária uma investigação individual analisando o transcriptoma para avaliar mRNAs com alteração na estabilidade após expressão ou depleção do sRNA (WATERS et al., 2016). Desta forma, para investigar a função do sRNA01 e da proteína Hfq na virulência de App, foram construídas linhagens sRNA *rna01 knockout* em diferentes linhagens parentais, wt (tipo selvagem) e Δhfq (SANCHES, 2018).

A análise de predição de alvos mostrou RNAs mensageiros (RNAm) relacionados às vias metabólicas centrais e componentes estruturais de membrana, como proteínas e lipídeos (SANCHES, 2018). Além disso, testes preliminares em *Galleria mellonella* mostraram potencial atenuação da linhagem wt_ Δ rna01 (SANCHES, 2018). No entanto, são necessários experimentos complementares para avaliar o potencial da linhagem mutante para o sRNA01.

2.6. Aspectos imunológicos da PPS

O sistema imunológico é essencial para eliminar patógenos potenciais garantindo a homeostase do organismo (COICO; SUNSHINE, 2010). Do mesmo modo que App é capaz de invadir os tecidos hospedeiros por meio de seus fatores de virulência, o sistema imune do hospedeiro possui mecanismos eficientes para controlar a infecção por esse microrganismo.

Componentes da resposta imune inata são a primeira linha de defesa em resposta a infecção por App e os principais tipos celulares envolvidas nessa resposta são macrófagos, neutrófilos e monócitos (ONDRACKOVA et al., 2013). Experimentos *in vivo* mostraram que após 12 horas de contato com App há aumento das citocinas TNF- α (Fator de Necrose Tumoral) e IL-6 (Interleucina-6) em soro de suínos (WYNS et al., 2015). A produção de interleucina-17 (IL-17) por células Th17 também foi detectada após infecção (BROGAARD et al., 2015; SASSU et al., 2017). O aumento exacerbado da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α e a produção de óxido nítrico (NO) é uma característica da fase aguda da PPS onde, os sinais clínicos como febre alta e dificuldade respiratória são elevados (MÜLLEBNER et al., 2018).

Outro trabalho mostrou que cerca de 51 genes são diferencialmente expressos durante a infecção por App, entre eles os genes que codificam proteínas de fase aguda e citocinas como IL-1 (Interleucina-1), TNF- α , IL-6 e IL-8 (Interleucina-8) foram regulados positivamente (SKOVGAARD et al., 2010; HSU et al., 2016). Em resposta a infecção por App, neutrófilos e outros tipos celulares podem produzir o peptídeo antibacteriano PR-39 (GABNER et al., 2017) no entanto, esse peptídeo não é eficiente na inibição de App mas desempenha importante função no reparo dos tecidos fibrosos (XIE et al., 2017).

Como parte da resposta imune humoral, a produção de anticorpos é detectada entre 7 e 14 dias de infecção podendo persistir por meses (GARDNER et al., 1991). O principal anticorpo encontrado no soro de animais infectados com App é a imunoglobulina G1 ou G2a (IgG) (ZOU et al., 2011; LIU et al., 2013; YUAN et al., 2018). Os anticorpos produzidos podem neutralizar as toxinas Apx e auxiliar a fagocitose via opsonização, reduzindo os sintomas clínicos da doença (CRUIJSEN et al., 1995) no entanto, não é capaz promover a completa remoção de App

dos tecidos hospedeiros (SASSU et al., 2017). Sabe-se que a fase crônica da PPS é caracterizada pela persistência de App nas tonsilas e elevada produção de anticorpos e aumento da produção de IL-10, uma citocina imunossupressora da resposta inflamatória (MÜLLEBNER et al., 2018).

Na literatura há poucas informações sobre a resposta imune mediada por células (SASSU et al., 2017). No entanto, foi mostrado que a hipersensibilidade tardia mediada por células está relacionada positivamente com a produção de anticorpos (FURESZ et al., 1997). Sassu et al (2017) mostraram recentemente que a presença de células do tipo Th17 no sangue e pulmão de suínos com PPS na fase crônica, apresentam relação positiva com presença de lesões pulmonares e elevada produção de anticorpos. Ainda não se sabe a função das diferentes populações de células T na fase crônica da PPS, sendo assim, são necessários estudos que caracterizam a resposta imune mediada por células devido à alta relevância na prevenção da PPS.

2.7 Vacinas vivas atenuadas descritas para *A. pleuropneumoniae*

A produção de vacina viva atenuada (do inglês *Live Vaccine Attenuated* - LAV) pode ser altamente eficiente, uma vez que são versões atenuadas de um patógeno com capacidade de induzir resposta imune no hospedeiro (CABRAL et al., 2017). LAV são utilizadas frequentemente para erradicação de patógenos respiratórios humanos e infecções frequentes em animais de rebanho (LEE et al., 2005). A atenuação da virulência geralmente é obtida por seleção natural, mutagênese aleatória ou modificações de genes alvos importantes para patogenicidade (CABRAL et al., 2017).

Entre os 18 sorotipos descritos para App, muitos estão envolvidos em sintomas graves e diferenciais tornando-se um desafio para a produção de uma vacina amplamente protetiva, principalmente por envolver graus distintos de virulência (ANTENUCCI et al., 2018). Diante desse desafio, é desejável que a vacina ofereça proteção contra colonização e morbidade de App de forma ampla a todos os sorotipos (ANTENUCCI et al., 2018).

Na literatura, são descritas algumas vacinas vivas atenuadas com elevado potencial imunoprotetor para App (tabela 1). No entanto, apesar dos resultados positivos, as vacinas atuais não previnem a colonização infecção ou a transmissão (SASSU et al., 2017). Além disso, não têm significância para o mercado global, o que pode ser justificado devido às leis de cada país sobre organismos geneticamente modificados (LOERA-MORO et al., 2018) e até mesmo, ao seu potencial limitado de proteção para App.

Tabela 1: Vacinas vivas atenuadas contra *A. pleuropneumoniae* descritas na literatura.

Linhagem mutante	Sorotipo	Parâmetros alcançados	Referência
<i>A. pleuropneumoniae</i> ΔapxIC/P36+	10	Respostas específicas IgG e elevada imunização de camundongos	Zou et al., 2011
ΔapxIC/ompP2	5	Alta produção de IgG em camundongos vacinados	Liu et al., 2013
ΔapxIIIB/ΔapxIIID	2	Protege 100% dos suínos infectados com a linhagem selvagem	Park et al., 2009
apxIC/apxIIC/apxIV/orf1	1	Entre 80 % e 90 % de sobrevivência de suínos infectados	Fu et al., 2013
ΔznuA	1	80% de sobrevivência de suínos imunizados	Yuan et al., 2014
ΔapxIC/ΔapxIIC/Δorf1/ΔcpxA R/ΔarcA	1	Sobrevivência de 100 % dos camundongos imunizados	Yuan et al., 2018

Apesar de amplas pesquisas para obtenção de uma vacina viva atenuada com linhagens mutantes imunogênicas, não há na literatura a descrição de uma linhagem *knouckout* para um pequeno RNA capaz de impactar negativamente a virulência de App. Diante disso, este trabalho realizou a caracterização fenotípica do mutante *knouckout* para o sRNA01 em busca de compreender sua função na regulação da virulência de App e o potencial da linhagem wt_ Δ rna01 como vacina viva atenuada.

3. HIPÓTESE

O RNA pequeno Rna01 é capaz de regular positivamente a virulência de *A. pleuropneumoniae* e sua ausência apresenta atenuação da virulência e mantém a resposta imune celular.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos funcionais do pequeno Rna01 na regulação da virulência de *A. pleuropneumoniae* 2331 e o potencial da linhagem WT_Δ*rna01* como candidata a vacina viva atenuada.

4.2 Objetivos específicos

- Obter uma linhagem de *A. pleuropneumoniae* 2331 Δ*rna01* com fenótipo selvagem restaurado (Δ*rna01C*);
- Avaliar a cinética de crescimento das linhagens selvagem e mutantes;
- Avaliar a adesão das linhagens em superfície abiótica;
- Verificar o perfil proteico e quantificar a produção de vesículas extracelulares (EVs) pelas linhagens parentais e mutantes;
- Avaliar a sobrevivência e melanização de larvas de *G. mellonella* como modelo alternativo de infecção;
- Mensurar a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró (IL-6, IL-12 e TNF-α) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) em sobrenadante de cultura secundária de macrófagos RAW 264.7 infectados;
- Avaliar a taxa de infecção e o número de bactérias por macrófagos infectados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Linhagens bacterianas, condições de crescimento e manutenção

Todas as linhagens de App utilizadas neste trabalho (tabela 2) foram cultivadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion - Becton Dickinson) suplementado com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - NAD (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 37 °C por 24 horas em atmosfera gasosa de CO₂ a 5 % ou em 10 mL de caldo BHI suplementado com NAD (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com agitação contínua de 180 rpm pelo tempo indicado para cada experimento. Para os mutantes de App MIDG 2331, WT_Δ*rna01* e Δ*hfq*_Δ*rna01* foram adicionados Trimetoprim 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sigma, St. Louis, MO, USA). As linhagens foram estocadas em meio BHI com glicerol 20 % e mantidas à -80 °C.

Tabela 2: Linhagens bacterianas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* utilizadas neste trabalho.

Linhagem App	Genótipo	Sorotipo	Referência
MIDG2331	WT	8	Bossé et al., 2016
	WT_Δ <i>hfq</i>	8	Crispim, 2014
	WT_Δ <i>rna01</i>	8	Sanches, 2018
	Δ <i>hfq</i> _Δ <i>rna01</i>	8	Sanches, 2018
	Δ <i>arfA</i>	8	Teixeira, 2018
L20	WT	5b	Foote et al., 2008

5.2 Obtenção e confirmação da linhagem Δ*rna01C*

Para obtenção da linhagem complementar, Δ*rna01C*, foi utilizada a estratégia de PCR *overlapping extension* (OE) descrita por Shevchuk e colaboradores (2004) com algumas alterações (ANEXO A). Para construção do cassete, foram obtidos três *amplicons*. O primeiro *amplicon*, (*primers* 1 e 2, tabela 3) contempla o gene do Rna01 e parte do gene *eriC downstream*. O segundo *amplicon* (*primers* 5 e 6, tabela 3) carrega parte do gene *sbcB upstream* ao Rna01 no genoma de MIDG2331. O terceiro fragmento obtido, possui o gene de resistência a cloranfenicol (gene *cat*), e uma sequência com nove bases (5'ACAAGCGGT'3) denominada DUS (DNA *uptake system*), requerida para a transformação natural de App (BOSSÉ et al., 2014). Esse último fragmento, foi obtido por PCR (*primers* 3 e 4) utilizando a linhagem Δ*arfA* (TEIXEIRA, 2018). Para todas as reações de PCR utilizamos *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O fragmento foi tratado com a enzima de restrição *DpnI* (Promega, Madison, WI, EUA) para clivagem de DNA metilado (N6-metilação no resíduo de adenina) e purificado com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A transformação natural de App foi realizada conforme descrito por

Bossé e colaboradores (2014). A linhagem complementada foi selecionada em BHI suplementado com NAD ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e cloranfenicol ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$).

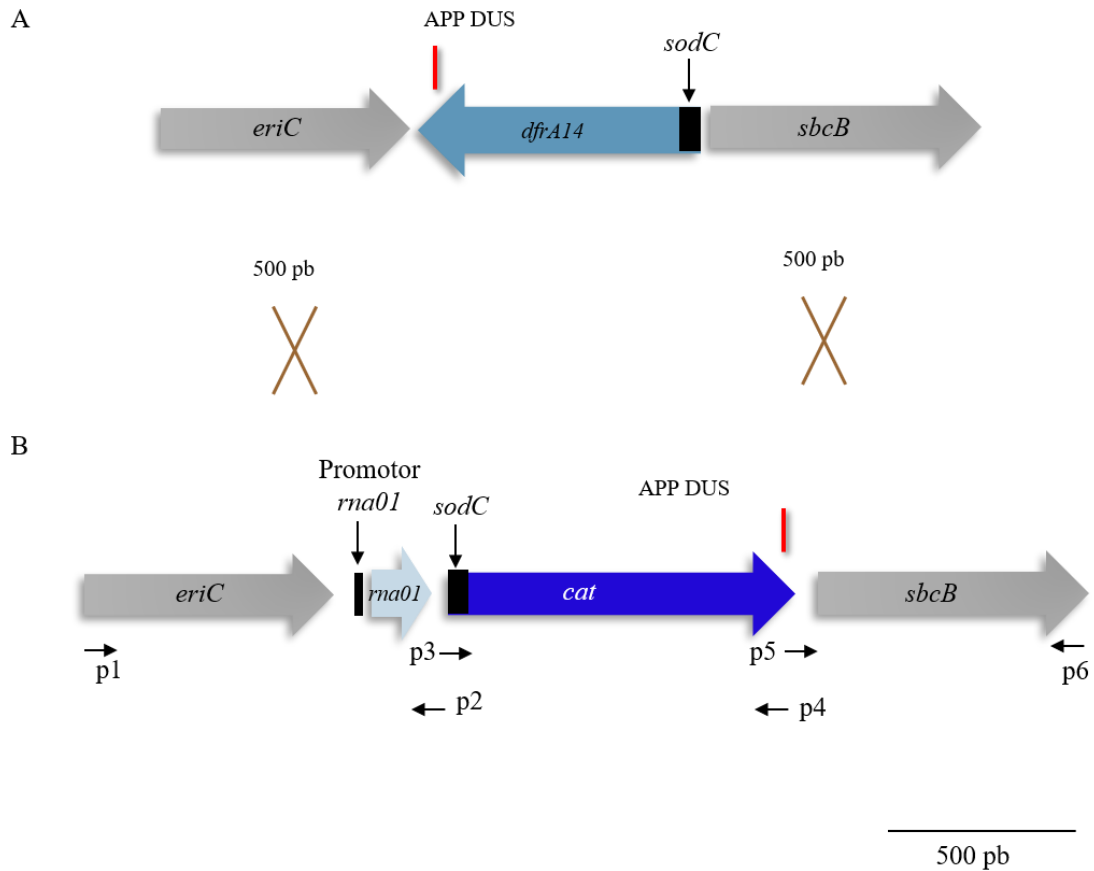


Figura 1: Estratégia utilizada para restaurar o fenótipo selvagem da linhagem wt_Δ*rna01*. (A) Resultado final da estratégia utilizada por Sanches (2018) para construção do mutante para o sRNA01. Os genes *sbcB* e *eriC*, *upstream* e *downstream* ao cassete *dfrA14*, que substituiu o gene *rna01*, com seu promotor *sodC* e a sequência DUS. (B) Esquema do cassete utilizado para complementação. Gene de resistência a cloranfenicol (gene *cat*) com seu promotor *sodC* e a sequência DUS. A região em marrom mostra os 500 pares de bases onde haverá recombinação do cassete no genoma de App MIDG 2331 mutante para o Rna01. As setas mostram as regiões onde cada *primer* (mostrados na tabela 3) foi utilizado para obtenção dos fragmentos.

Tabela 3: *Primers* utilizados para construção da linhagem Δ rna01C. Região em cinza representa a cauda dos *primers* onde ocorre sobreposição dos fragmentos.

Primer	Identificação	T _m °C	Sequência (5'- 3')
1	RNA01_left_for	61	GGGTTATGATGTTGTTGCAAGAGC
2	RNA01_left_rev_cat	71	GTATGCATAATGGCGGGCATAAAA AAACCCGGCACC
3	cat_RNA01_for	70,2	GGGTTTTTTTTATGCCCGCCATTATG CATACTACGATTAC
4	cat_RNA01_rev	71,1	GGGCATAAAACAACCACAAGGGA TTTTTTTATGCCAAACCG
5	RNA01_rt_for_cat	69,7	AAAAAATCCCTTGTCGGTTGTTTT ATGCCCGCAATTC
6	RNA01_rt_rev	59,9	TGCATAACAAGCTCGAACAAGATC

5.3 Determinação da cinética de crescimento de App

As bactérias foram inoculadas em BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubadas *overnight* a 37 °C, atmosfera 5% de CO₂. As bactérias foram inoculadas em 50 mL de BHI-NAD em erlenmeyer de 125 mL (com diâmetro de 6 cm) sob agitação de 180 rpm e aerobiose, por 24h. A densidade óptica (DO₆₀₀) inicial foi ajustada para 0,1 e mensurada inicialmente a cada 20 minutos nas primeiras cinco horas e posteriormente, a cada 1 hora até atingir 12 horas de crescimento. O experimento foi realizado em triplicata biológica. Os dados obtidos em valores de DO₆₀₀ foram utilizados para determinar o crescimento máximo. E para determinar a velocidade máxima de crescimento (μ) os dados em DO₆₀₀ foram plotados em escala semi-logarítmica (eixo x está em escala aritmética e eixo y em escala logarítmica como lnDO₆₀₀). Foi identificada a fase linear de variação dos dados de lnDO₆₀₀ em relação ao tempo e calculou-se a regressão linear dos dados onde foi extraído o coeficiente angular da reta. A partir da regressão linear foi possível obter o valor de μ em unidade de h⁻¹.

5.4 Ensaios de adesão em microplaca

Para determinar o potencial de adesão das linhagens, o experimento foi realizado de acordo com Stepanović e colaboradores (2007), com algumas alterações. Foram utilizadas

placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Kasvi, São José do Pinhais, Paraná, Brasil). As linhagens foram inoculadas em BHI-NAD acrescido ou não de trimetoprim ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubadas *overnight* a 37°C , atmosfera de CO_2 a 5%. Posteriormente, as bactérias foram transferidas para meio líquido BHI-NAD e a DO_{600} inicial ajustada para 0,1. O volume de $150 \mu\text{L}$ do inóculo homogeneizado foi transferido para cada poço da microplaca, que foi incubada por 24 horas a 37°C , atmosfera 5% de CO_2 . Após 24 horas, foram realizados os seguintes tratamentos: 3 lavagens com água destilada; adição de $150 \mu\text{L}$ de cristal violeta (0,1%) e 3 lavagens com água destilada para remoção do excesso de cristal violeta. Para quantificação das células aderidas, foram adicionados $150 \mu\text{L}$ de etanol 95% em temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) utilizando um comprimento de onda de 590 nm. Foi utilizado como branco apenas o etanol 95%. O experimento foi realizado em triplicata biológica com seis repetições experimentais cada.

5.5 Extração e purificação de vesículas extracelulares (EVs) produzidas por App

Para determinar alterações no perfil proteico e na produção de EVs pelas linhagens mutantes de App, a extração e purificação foram feitas conforme Antenucci e colaboradores (2017), e modificações realizadas por Silva (2018). Todas as linhagens foram inoculadas *overnight* em meio sólido BHI-NAD, acrescidas ou não com Trimetoprim $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. No dia seguinte, foram inoculadas em 20 mL de BHI-NAD, a DO_{600} foi ajustada para 0,1 e incubadas *overnight* a 37°C em agitação de 180 rpm. Posteriormente, uma alíquota da cultura foi inoculada em 600 mL de BHI-NAD a uma DO_{600} de 0,1 e cultivada por 8 horas. O sobrenadante da cultura foi centrifugado ($5.000 \times g$) a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, Billerica, MA, USA). O filtrado foi adicionado em uma membrana de diálise de 1000 kDa (Biotech CE Tubing - Spectrumlabs) envolta em uma coluna de vidro selada com uma película transparente e incubado *overnight* a 4°C . Adicionou-se 600 mL de PBS para lavar o filtrado, que foi incubado *overnight* a 4°C . No dia seguinte, o filtrado foi dialisado em PBS sob-baixa agitação por 24 h. Por fim, as amostras foram filtradas em uma membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA) e concentradas em coluna Amicon de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA). As amostras foram armazenadas a -20°C até o uso em posteriores análises.

5.5.1 Determinação de proteínas das EVs por SDS-PAGE

Gel de poliacrilamida (12%) corado com azul de Coomassie (SAMBROOK et al., 1990) foi utilizado para detecção de possíveis alterações no conteúdo proteico das EVs extraídas e para determinar alteração do conteúdo proteico total das linhagens mutantes e selvagens em diferentes fases de crescimento (primeira coleta após 8 horas de crescimento, final fase log e segunda na metade da fase estacionária). Após a obtenção dos *pellets* por centrifugação a 6500 xg por 15 min, as células foram adicionadas a tubos de lise (Matrix B, MP Biomedicals) e levadas ao homogeneizador (Precellys® Evolution - Bertin Instruments) duas vezes por 30 segundos. Posteriormente, foram centrifugadas a 4500 xg por 10 min à 4 °C e o sobrenadante foi coletado. As amostras foram preparadas com adição do tampão de amostra (50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8; 100 mmol.L⁻¹ ditioneitol; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 10%) e aquecidas à 100 °C por 10 minutos.

5.5.2 Estimativa da produção de EVs pelas linhagens

O conteúdo proteico das amostras de EVs e proteínas totais (descritas no item anterior) foram quantificadas usando o reagente Bradford (Sigma, St. Louis, MO, USA), a partir da curva padrão de BSA (0,1 a 1,4 µg.mL⁻¹). A diferença na produção de EVs entre as linhagens foi determinada pela padronização de um volume final e, posteriormente, relacionada ao resultado da quantificação.

5.5.3 Observação da morfologia das EVs por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para avaliar possíveis alterações na morfologia das EVs, foram adicionadas 5 µL das amostras de EVs em *grids* revestidas de carbono, coradas com de acetato de uranila (3 %) e posteriormente, analisadas por MET. A visualização das amostras foi realizada pelo microscópio de transmissão eletrônica, Zeiss Libra 120, localizado no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

5.6 Ensaios de virulência em *Galleria mellonella*

5.6.1 Análise de sobrevivência

As larvas de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) utilizadas foram mantidas no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Bioagro, UFV em sistema contínuo de produção. As larvas se mantiveram com alimentação restrita a base de farelo de trigo, germen de trigo leite em pó, levedo de cerveja, mel e glicerol. O experimento foi realizado com as larvas

em seu último instar (PEREIRA et al., 2015). As linhagens bacterianas foram crescidas em BHI líquido acrescido de NAD ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) até DO_{600} 0,5. Foram aplicados $10 \mu\text{l}$ de suspensão bacteriana a DO_{600} de 2 no penúltimo pseudópode da larva utilizando a seringa SGE $25 \mu\text{l}$ (Trajan Scientific and Medical). Posteriormente, as larvas foram armazenadas na estufa 37°C . As larvas foram monitoradas após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção. Foram consideradas mortas às larvas que não mostravam nenhum estímulo ao toque. O mesmo experimento foi conduzido com as larvas inoculadas com EVs produzidas pelas linhagens selvagem e mutantes. Foi inoculado um volume de $20 \mu\text{l}$ a uma concentração de $20 \mu\text{g}$ de EVs. Os controles negativos foram larvas inoculadas com PBS e a proteína albumina bovina sérica (BSA – Pierce, Rockford, IL, USA), como controle de concentração.

5.6.2 Avaliação da melanização da hemolinfa das larvas de *G. mellonella*

Para quantificação da melanização da hemolinfa, a mesma foi coletada e centrifugada a $9500 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Posteriormente, a amostra foi diluída pela adição de $40 \mu\text{l}$ de solução anticoagulante esterilizada, em $10 \mu\text{l}$ de hemolinfa. Foram adicionados $50 \mu\text{l}$ da diluição em placa de 96 poços e realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 405 nm (JORJÃO, 2016).

5.7 Análises em cultura de macrófagos RAW 264.7

5.7.1 Determinação da produção de óxido nítrico

Para determinar a produção de óxido nítrico, foi utilizada cultura de macrófagos de linhagem RAW 264.7. As células foram descongeladas em temperatura ambiente e expandidas em frascos de cultura celular de 75 cm^2 (Kasvi, São José do Pinhais, Paraná, Brasil), em meio DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com soro fetal bovino (SFB - LGC BIOTECNOLOGIA, Cotia, SP, BR) 20% e 1% penicilina G 100 U/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 7,2, e mantidos a 37°C , 5% de CO_2 . Os repiques de manutenção foram feitos a cada dois dias por raspagem de células, utilizando um espalhador de células descartável (Kasvi, São José do Pinhais, Paraná, Brasil). Foram distribuídos 5×10^5 células viáveis de macrófagos em microplacas de 24 poços por 24 horas a 37°C , 5 % de CO_2 e posteriormente, foram infectados com as linhagens de App (proporção 1:1). O sobrenadante foi coletado após 48 horas e a concentração de nitrito foi mensurada pelo reagente de Griess (Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizando um comprimento de onda de 540 nm (GRISHAM et al., 1996).

5.7.2 Determinação da taxa de infecção e do número de bactérias por macrófagos infectados

Antes de adicionar a cultura de macrófagos à placa de 24 poços, foram inseridas lamínulas circulares de 13 mm aos poços. Após as 48 horas de infecção (1:1), as lamínulas foram lavadas com PBS e deixadas secando em temperatura ambiente. Posteriormente, foram coradas com o kit panótico (Loreclin produtos para laboratórios, Pinhais, PR, Brasil). As lamínulas foram levadas ao microscópio óptico e selecionou-se aleatoriamente 100 macrófagos para determinar taxa de infecção, como mostra a fórmula:

$$\text{Taxa de infecção (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de macrófagos infectados} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de macrófagos contados}}$$

Além disso, foi determinado o número de bactérias por macrófagos infectados, onde:

$$\text{N}^\circ \text{ de bactéria por macrófago infectado} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total bactérias nos macrófagos infectados}}{\text{n}^\circ \text{ de macrófagos infectados}}$$

5.7.3 Avaliação da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias

Os sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com as linhagens bacterianas na proporção de 1:1 foram coletados após 48 horas de incubação para detecção de citocinas pró (IL-6, IL-12 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) usando Citometria de Fluxo (kit BD - Cytometric Bead Array - CBA). Os dados foram coletados usando BD FACs Verse (BD Biosciences - Immunocytometry Systems, San Diego, CA, USA) e analisados com o *software* FCAP 3.0 de acordo com as instruções do fabricante.

5.7 Análises estatísticas

Análises estatísticas e gráficos foram feitos com o auxílio dos *softwares* Minitab 18 e SigmaPlot 12.0. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Tratamentos comparados com o controle foram feitos pelo teste de Dunnett ($p \leq 0.05$) e entre eles pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Foi utilizado o teste t de Student (5%) para comparações das análises de citocinas realizados por citometria de fluxo.

6 RESULTADOS

6.1 Construção do cassete de complementação da linhagem App $\Delta rna01: rna01C_cat$

Para obtenção da linhagem com fenótipo selvagem restaurado, o cassete $\Delta rna01_cat$ foi obtido com o objetivo de substituir o gene que codifica o sRNA, *rna01* interrompido pelo gene *dfrA14*, que confere resistência a trimetoprim, previamente obtido por Sanches (2018) (Figura 2). As etapas de obtenção do cassete foram realizadas com sucesso e três *amplicons* com os tamanhos esperados foram obtidos (Figura 2A). O primeiro *amplicon*, (*primers* 1 e 2) contempla o gene do sRNA01 e parte do gene *eriC*. O segundo *amplicon* (*primers* 5 e 6) carrega parte do gene *sbcB upstream* ao sRNA01 no genoma de MIDG2331. E o terceiro *amplicon* (*primer* 3 e 4), amplificado do genoma da linhagem App $\Delta arfA$, contém o gene *cat* utilizado como marcador de seleção (Figura 2A). Os fragmentos obtidos possuem caudas complementares entre si e por *Overlapping* PCR foi obtido o cassete final de restauração do fenótipo tipo selvagem com 1.956 pb de tamanho (Figura 2B).

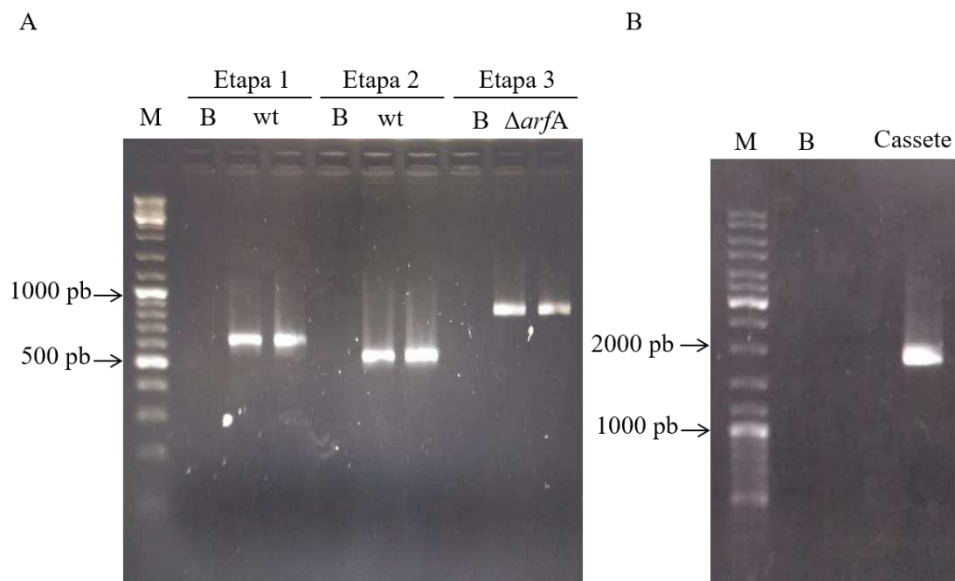


Figura 2: Estratégia de construção do cassete de restauração fenotípica denominado *rna01_cat*. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5 % contendo os três *amplicons* obtidos a partir das 3 etapas descritas na Figura 2. (B) Eletroforese em gel de agarose 0,8 % para a confirmação da obtenção do cassete de DNA com 1.956 pb obtido a partir da técnica de PCR *overlapping* (OE) (*primers* 1 e 6). M: O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific); B: branco; Etapa 1 - *amplicon* de 615 pb (*primers* 1 e 2); Etapa 2 - *amplicon* de 545 pb (*primers* 5 e 6); Etapa 3 - *amplicon* de 848 pb (*primers* 3 e 4).

O próximo passo foi a transformação natural conforme descrito por Bossé e colaboradores (2014). Após a realização desta etapa (por oito vezes) nenhum transformante foi obtido. Em todas as etapas de transformação natural foi utilizada a linhagem *A. pleuropneumoniae* 2331 WT como controle. No entanto, não foi obtido êxito, sugerindo que as linhagens perderam a capacidade de transformação natural, principalmente pelo tempo longo de estocagem em temperatura de -80°C , sem um agente crioprotetor apropriado e pelas sucessivas etapas de descongelamento para repicagens.

6.2 Análise de crescimento

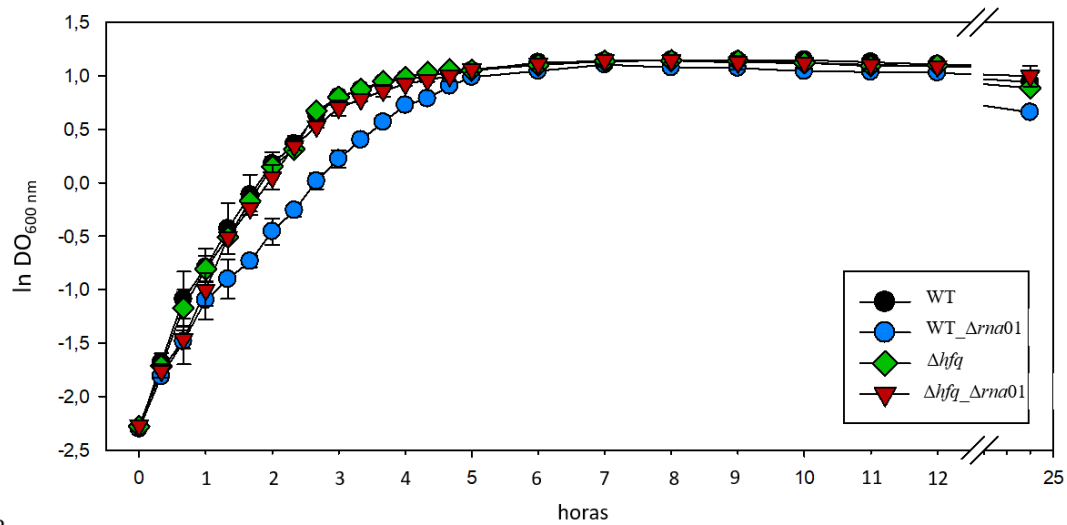
Em primeiro momento, a curva de crescimento foi iniciada com uma DO_{600} de 0,01. A linhagem mutante *wt_Δrna01* apresentou crescimento atingindo uma DO_{600} máxima de 0,5 em nove horas.

Desta forma, a DO_{600} inicial de 0,1 foi adotada para os demais experimentos. Os resultados mostraram diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre o μ (h^{-1}) da linhagem mutante *WT_Δrna01*, em relação ao μ (h^{-1}) da linhagem selvagem (WT) e as outras linhagens mutantes analisadas (Figura 3). Contudo, o crescimento máximo de todas as linhagens investigadas não mostrou diferença significativa ($p \leq 0.05$) (Tabela 4).

Com o objetivo de determinar a população bacteriana no ponto específico em que a DO_{600} atingisse 0,5, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). A linhagem WT apresentou cerca de $4,55 \times 10^8$ UFC/mL, assim como a linhagem *WT_Δrna01* com $1,49 \times 10^8$ UFC/mL. Os mutantes *Δhfq* e *Δhfq_Δrna01* apresentaram uma população de $4,46 \times 10^8$ e $5,1 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente.

Os resultados obtidos a partir dos dados de \ln de DO, para a linhagem selvagem (WT), apresentaram indícios de duas fases log (Figura 3B e Tabela 5). Com base nessas observações, foram determinados dois possíveis valores de μ (h^{-1}) para a linhagem selvagem que foram, posteriormente, comparados com os mutantes (Tabela 5). Apenas a primeira fase log proposta, apresenta diferença significativa ($p \leq 0.05$), em comparação com os mutantes.

A



B

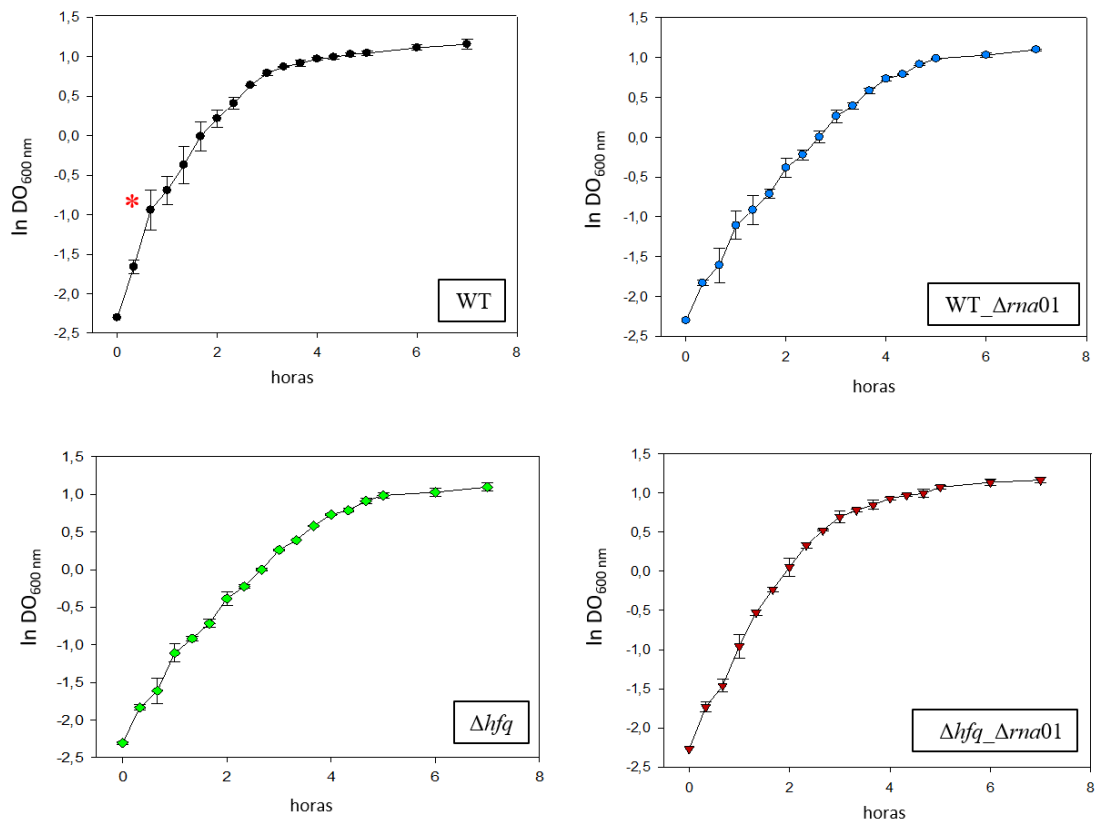


Figura 3: Perfil de crescimento das linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01. (A) Curva de crescimento em ln DO_{600 nm} de todas as quatro linhagens de *A. pleuropneumoniae* investigadas. (B) Perfil de crescimento de cada linhagem investigada. O último ponto (sete horas) representa o crescimento máximo das linhagens. * representa o final da primeira fase logarítmica observada para linhagem de App WT.

Tabela 4: Valores de velocidade de crescimento específica máxima μ (h^{-1}) e crescimento máximo (valores referentes a DO_{600}) das linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01*. A média dos valores de cada atributo das três réplicas biológicas independentes foram comparadas por ANOVA. Os valores marcados com fundo cinza, indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) da linhagem WT_Δ*rna01* em relação ao seu parental (WT).

	Linhagens bacterianas			
	WT	WT_Δ <i>rna01</i>	Δ <i>hfq</i>	Δ <i>hfq_Δrna01</i>
μ (h^{-1})	0,3493	0,2725	0,355	0,3528
Crescimento máximo	3,18	3	3,05	3,18

Tabela 5: Valores de velocidade de crescimento específica máxima comparada entre as linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01*. Os valores marcados com fundo cinza, indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) das linhagens mutantes WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01* em relação à linhagem WT. *valor de μ (h^{-1}) obtido nos três pontos iniciais (40 minutos) da curva de crescimento da linhagem selvagem **valor de μ (h^{-1}) obtido do quarto ao sétimo ponto da curva de crescimento da linhagem selvagem (a partir de 40 minutos até 2 horas).

	Linhagens bacterianas			
	WT	WT_Δ <i>rna01</i>	Δ <i>hfq</i>	Δ <i>hfq_Δrna01</i>
μ (h^{-1})	*0,6756	0,2725	0,355	0,3528
	**0,2938	0,2725	0,355	0,3528

6.3 Adesão de App em microplaca

Para investigar se o sRNA01 está envolvido no processo de adesão de *A. pleuropneumoniae* MIDG2231, as linhagens parentais (WT e Δ*hfq*) e as linhagens mutantes WT_Δ*rna01* e Δ*hfq_Δrna01* foram cultivadas em meio BHI/NAD em microplaca de 96 poços por 24 horas, a 37 °C. O padrão de adesão das linhagens mutantes Δ*hfq*, WT_Δ*rna01* e Δ*hfq_Δrna01* foi diferente da linhagem parental WT. A linhagem parental WT mostrou deposição de células em pontos específicos dos poços, com formação de grumos, enquanto as linhagens mutantes, apresentaram aderência uniforme, sem a formação típica de grumos (Figura 4).

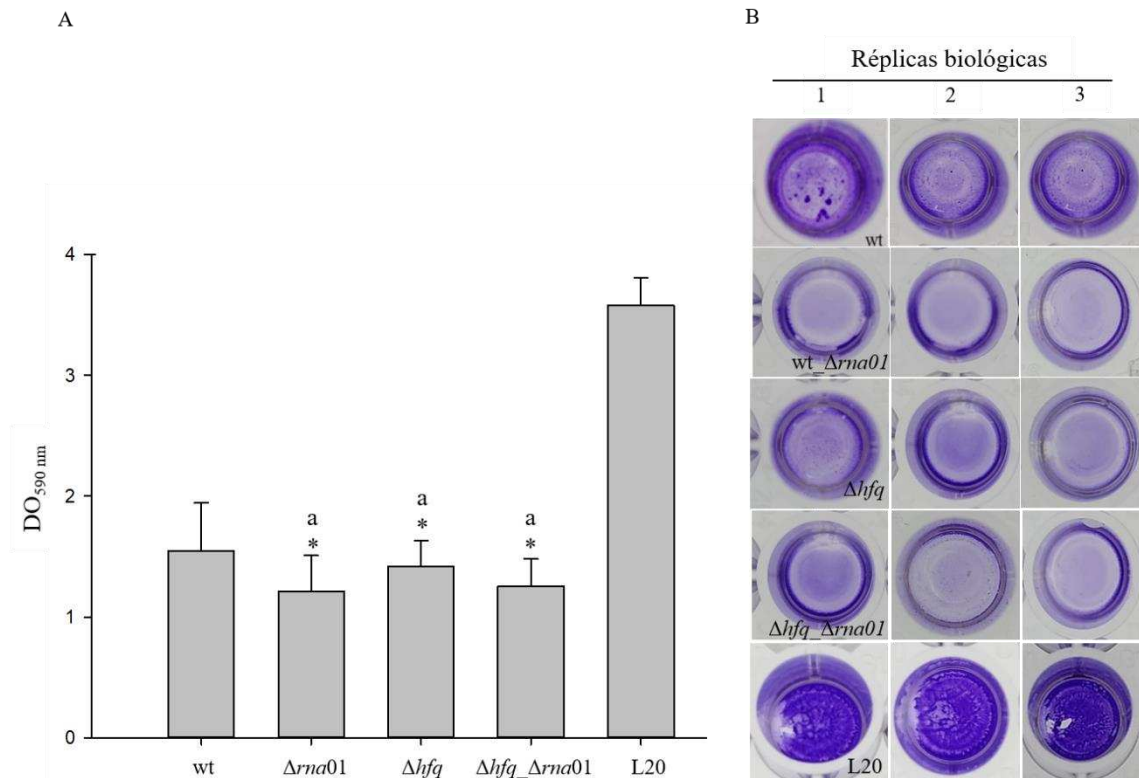


Figura 4: Adesão em microplaca de *A. pleuropneumoniae* pelo método do cristal violeta. (A) Valores de DO₅₉₀ obtidos para as linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_ $\Delta rna01$, Δhfq e Δhfq_rna01 . A linhagem referência *A. pleuropneumoniae* L20 sorotipo 5 foi utilizada como controle positivo de adesão. As médias de cada grupo foram comparadas por ANOVA. Grupos que compartilham a mesma letra não mostraram diferença estatística significativa pelo teste de Tukey. *Grupos que mostraram diferença em relação ao controle (WT) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0.05$). (B) Representação visual dos poços após a solubilização e remoção do cristal violeta.

6.4 Produção, morfologia e conteúdo de EVs produzidas pelas linhagens de *A. pleuropneumoniae*

Em análise de predição de alvos de sRNA para App, Sanches (2018) identificou os possíveis mRNAs alvos do sRna01 e suas respectivas funções, como por exemplos componentes da membrana externa do envelope celular de App. Desta forma, a produção e a caracterização das EVs das linhagens mutantes de App MIDG 2331 e suas respectivas linhagens mutantes foram investigados. Com o objetivo de determinar possíveis alterações no perfil e produção de EVs, as linhagens bacterianas foram cultivadas por 8 horas, representando o início da fase estacionária e posteriormente, foram extraídas.

As EVs produzidas por todas as linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01* investigadas revelou um perfil heterogêneo de forma e tamanho, os quais variaram de 20-30 nm, podendo alcançar até 100 nm. No entanto, em todos os campos fotografados e analisados foi possível verificar que as EVs produzidas pelas linhagens mutantes wt_Δ*rna01* e Δ*hfq_Δrna01* são menores e mais homogêneas que as EVs produzidas pela linhagem selvagem WT e wt_Δ*hfq*. Além disso, observou-se formação de agregados de EVs em todas amostras analisadas (Figura 5).

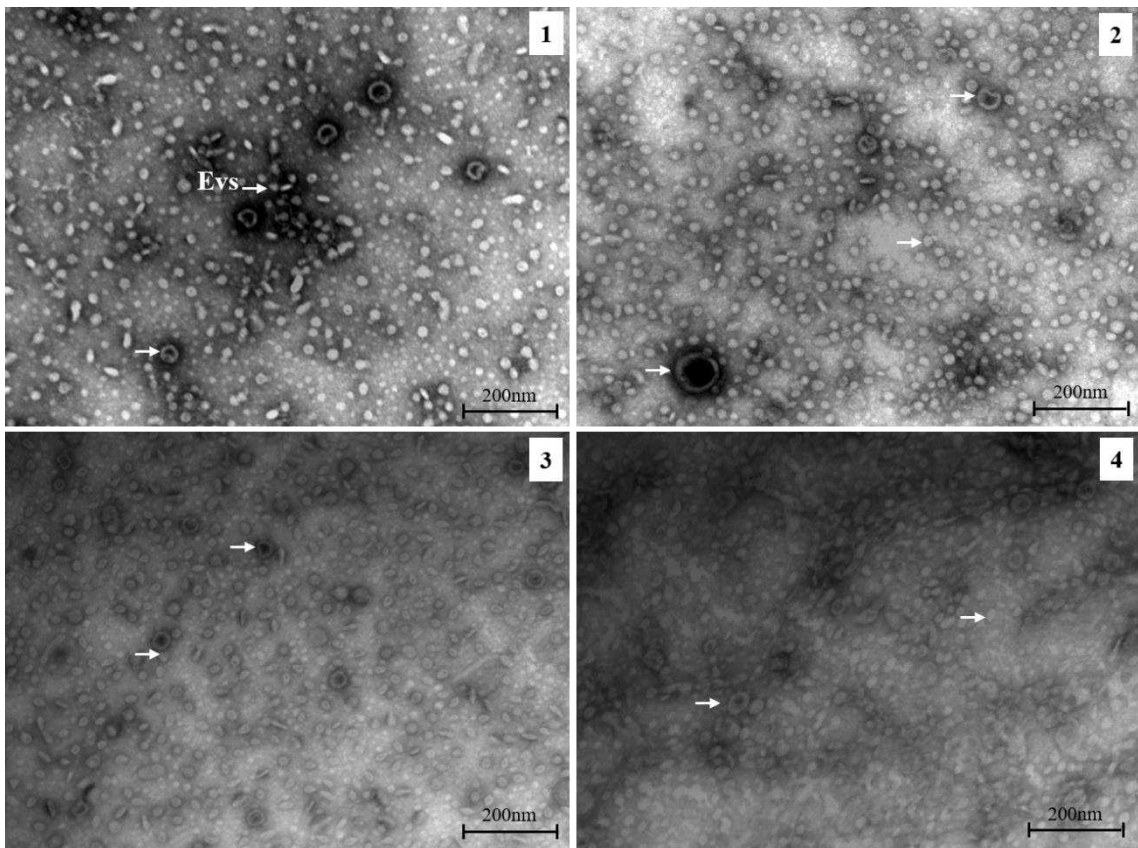


Figura 5: Morfologia das EVs produzidas pelas linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01* obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). **1:** WT; **2:** Δ*hfq*; **3:** WT_Δ*rna01*; **4:** Δ*hfq_Δrna01*. As setas brancas mostram a diversidade no tamanho das EVs produzidas por App.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) foi utilizada para analisar possíveis diferenças no perfil proteico das EVs produzidas pelas linhagens investigadas (Figura 6). As concentrações das proteínas totais foram estimadas pela curva padrão mostrada na figura 6B. Na figura 6A observa-se que o perfil proteico do mutante WT_Δ*rna01* é visivelmente diferente comparado ao do selvagem.

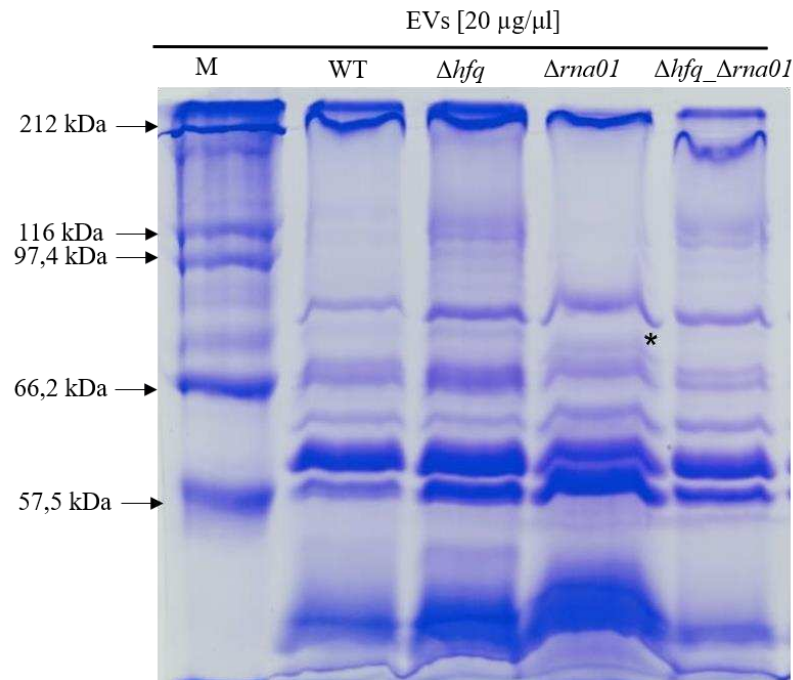


Figura 6: Perfil proteico das vesículas extracelulares produzidas pelas linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01*. SDS-PAGE mostrando o perfil proteico das EVs produzidas pelas linhagens de App investigadas. M: marcador molecular high-range de 212-40 kDa (Promega). *banda diferencial encontrada nas EVs da linhagem WT_Δ*rna01*.

Além de analisar o perfil de proteínas das EVs, possíveis alterações no perfil total de proteínas das células bacterianas foi investigada na tentativa de determinar se a diferença no estado fisiológico das células é afetada pela ausência do sRNA01. As proteínas totais foram analisadas em 8 e 12 horas de crescimento (Figura 7). Em relação ao perfil proteico total das linhagens investigadas, não foram observadas diferenças em relação à linhagem parental (WT). As diferenças encontradas foram apenas na intensidade das bandas entre as duas fases de crescimento.

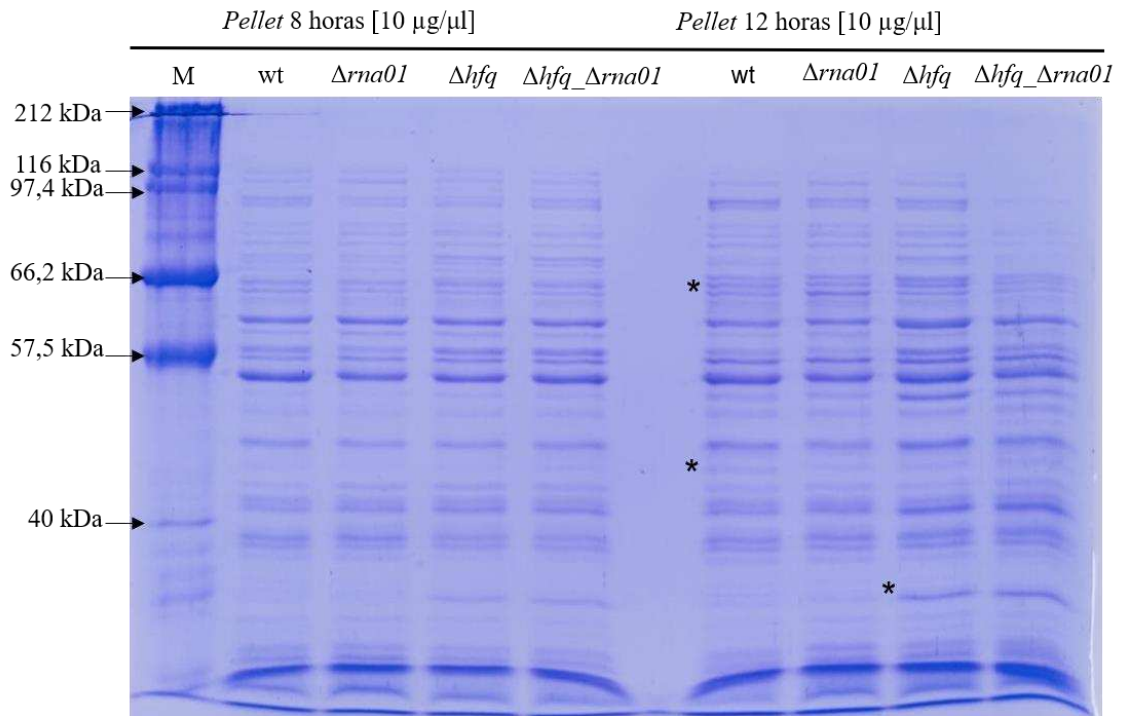


Figura 7: Perfil de proteínas totais obtidas a partir células das linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01 cultivadas em meio BHI/NAD em diferentes fases de crescimento (logarítmica e estacionária). M: marcador molecular high-range de 212-40 kDa (Promega). *indica as diferenças observadas no perfil proteico nas duas fases de crescimento.

As EVs foram quantificadas de acordo com item 5.5.2. A DO_{600} máxima encontrada após 8 horas de cultivo para as linhagens variou entre 3,0 e 2,8. Todas as linhagens mutantes apresentaram diferença estatística significativa na produção (μg de proteínas de vesículas/ μl) de EVs em relação a linhagem de App WT (Figura 8).

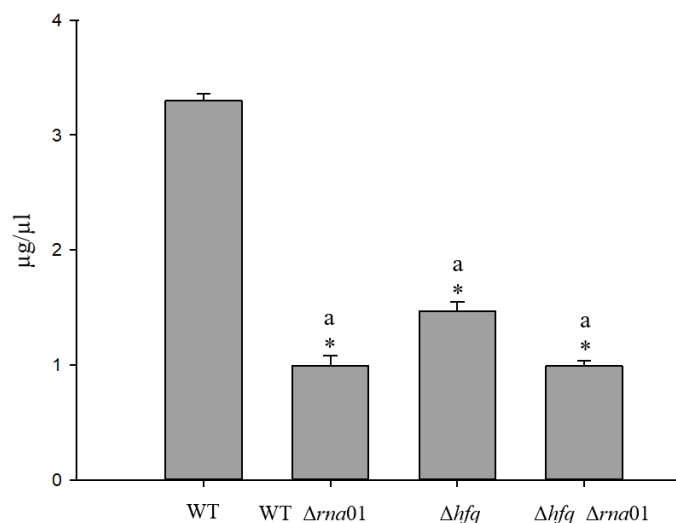


Figura 8: Produção de vesículas extracelulares por linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01. O experimento foi realizado em triplicata biológica. As médias foram comparadas por ANOVA. Grupos que compartilham a mesma letra não mostraram diferença estatística significativa pelo teste de Tukey. *grupos que mostraram diferença em relação à linhagem selvagem (WT) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0.05$).

6.7 Virulência de App em *G. mellonella*

A virulência das linhagens de App investigadas neste trabalho foi avaliada utilizando *G. mellonella* como modelo alternativo de infecção (Figura 9). O grupo de larvas infectadas com a linhagem selvagem WT apresentou 33% de sobrevivência em 96 horas. As larvas infectadas com linhagens mutantes WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01 apresentaram, respectivamente, 72%, 89% e 95% de sobrevivência após 96 horas de inoculação. Os resultados obtidos para as linhagens mutantes foram significativamente distintos da parental WT (Tabela 6). Além disso, a análise estatística mostrou que linhagem WT_Δrna01 foi também diferente das outras linhagens mutantes no modelo alternativo utilizado (Tabela 6). Como controle negativo foram utilizadas larvas inoculadas com PBS e larvas sem qualquer inoculação somente para controle de temperatura 37°C como um possível fator de estresse.

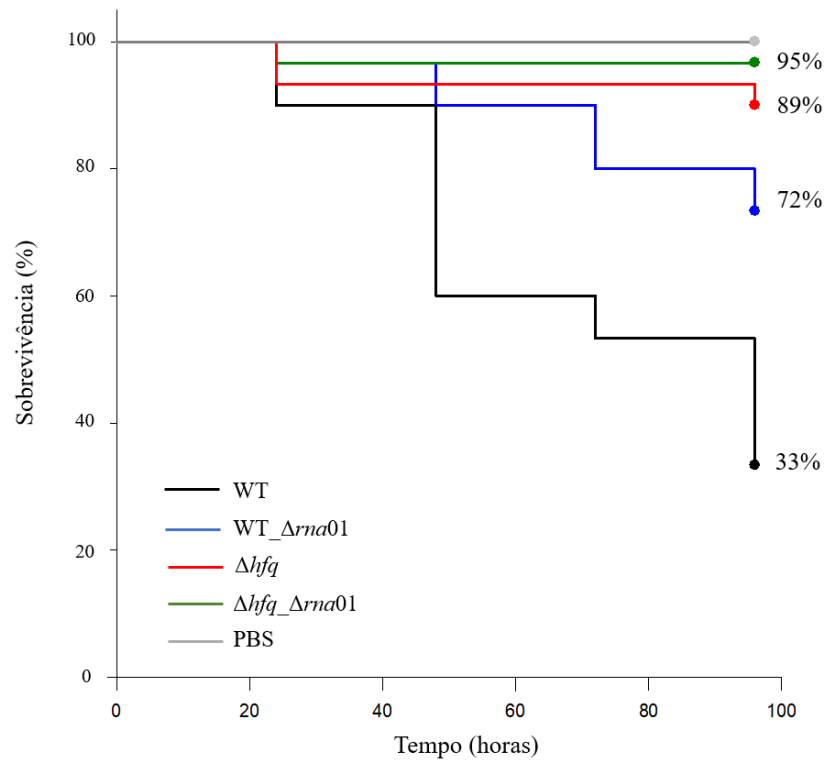


Figura 9: Virulência de linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01 no modelo alternativo *G. mellonella*. A sobrevivência das larvas foi avaliada através da estimativa de Kaplan-Meier a partir de três repetições biológicas, contendo três repetições experimentais com dez larvas em cada repetição. Valores de p-value entre as linhagens parentais e mutantes foram obtidos a partir da análise de log-rank sobre a curva de sobrevivência. As larvas sem inoculação apresentaram 100% de sobrevivência ao longo do período de avaliação e sem alteração fenotípica.

Tabela 6: Valores de *p-value* obtidos por comparação múltipla entre as linhagens analisadas. As regiões sombreadas em cinza, mostram significância estatística com *p-value* ≤ 0.05.

Linhagens mutantes	Selvagem WT	WT_Δrna01	Δhfq
WT_Δrna01	0,0136	-	-
Δhfq	4,09 ⁻⁶	0,0667	-
Δhfq_Δrna01	9,15 ⁻⁵	0,288	0,520

O efeito das EVs em larvas de *G. mellonella* também foi avaliado. Para isso, foram inoculados 20 μl de EVs (concentração final de 20 μg conforme quantificado no item 5.5.2). O

controle negativo foi constituído por larvas inoculadas com BSA (20 µg) e PBS (20 µl) (Figura 10A). Após a aplicação das EVs, as larvas apresentaram elevada melanização em apenas 30 minutos de inoculação (Figura 10B). Curiosamente, larvas inoculadas com EVs produzidas pelo mutante *WT_Δrna01* mostraram índices de 50 % de sobrevivência, apresentando efeito contrário ao anteriormente observado, em relação às larvas infectadas com o mutante *WT_Δrna01*. O grupo de larvas inoculadas com EVs produzidas pela linhagem *Δhfq_Δrna01* apresentou 90 % de sobrevivência. Já, 95 % sobreviveram aos efeitos das EVs produzidas pela linhagem selvagem *WT* e mutante *Δhfq*. Esses dados mostram uma diferença estatística significativa do mutante *WT_Δrna01* em relação aos controles e outras linhagens (Tabela 7). Os controles negativos não foram mostrados na figura 10A pois não houve morte ou qualquer tipo de alteração nas larvas (Tabela 7).

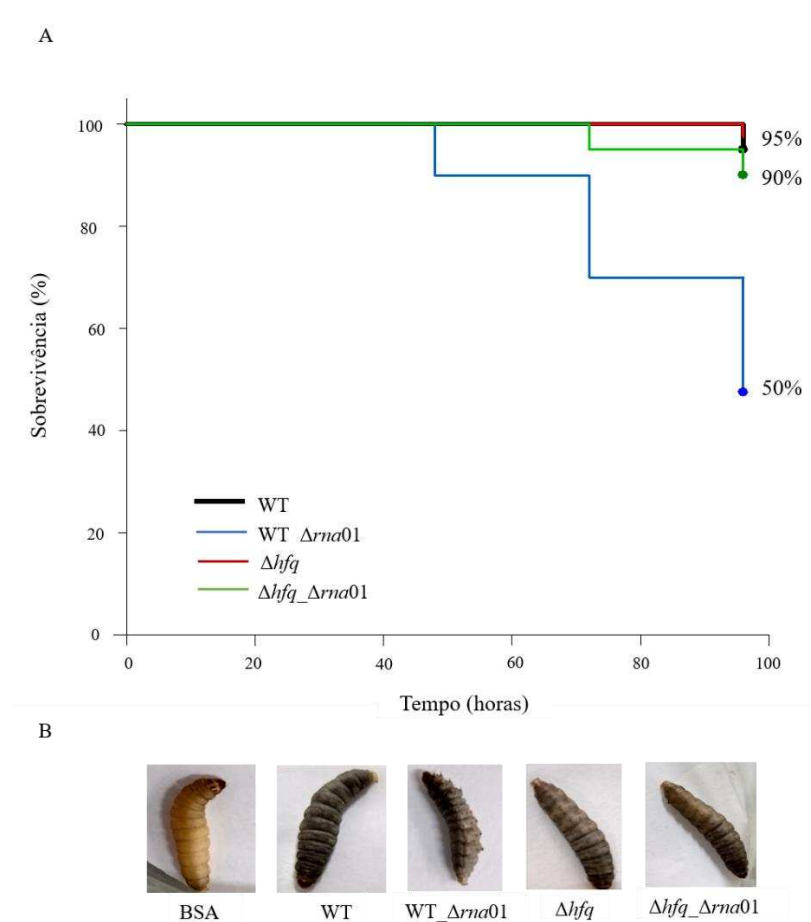


Figura 10: Ensaio de virulência em *G. mellonella* com EVs produzidas por linhagens de *A. pleuropneumoniae*. (A) Gráfico de sobrevivência (%). (B) Larvas após 30 minutos de inoculação com as EVs produzidas pelas linhagens investigadas.

Tabela 7: Valores de *p-value* obtidos por comparação múltipla entre as linhagens (EVs). As regiões em cinza, mostram significância estatística com *p-value* ≤ 0.05 .

Linhagens mutantes	Selvagem WT	WT_Δ<i>rna01</i>	Δ<i>hfq</i>
WT_Δ <i>rna01</i>	9,7 ⁻⁶	-	-
Δ <i>hfq</i>	0,559	2,9 ⁻⁶	-
Δ <i>hfq</i> _Δ <i>rna01</i>	0,620	1,5 ⁻⁴	0,416

6.8 Melanização da hemolinfa

Para quantificação da melanização ocorrida em larvas após a inoculação das linhagens bacterianas, a hemolinfa de cada larva foi coletada conforme descrito no item 5.6.3, adicionada em placa de 96 poços ($n = 8$) e diluída em tampão anticoagulante estéril (10 μL de hemolinfa em 40 μL de tampão anticoagulante). Após 5 min, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm. A coleta foi realizada a cada 24 horas durante 4 dias (Figura 11A). Como controle foram utilizados solução de PBS 1X e hemolinfa de larvas não infectadas.

Após 24 horas de inoculação com as respectivas linhagens bacterianas analisadas, foi observada melanização intensa da hemolinfa proveniente de larvas infectadas com as linhagens selvagem WT e mutante WT_Δ*rna01* em relação as outras linhagens mutantes. Após 24 horas de infecção, a linhagem WT_Δ*rna01* aumentou os níveis de melanização em relação à linhagem WT e os demais mutantes (Figura 11A). A figura 11B mostra as larvas ao longo das 96 horas de infecção, confirmando visualmente o aumento da melanização.

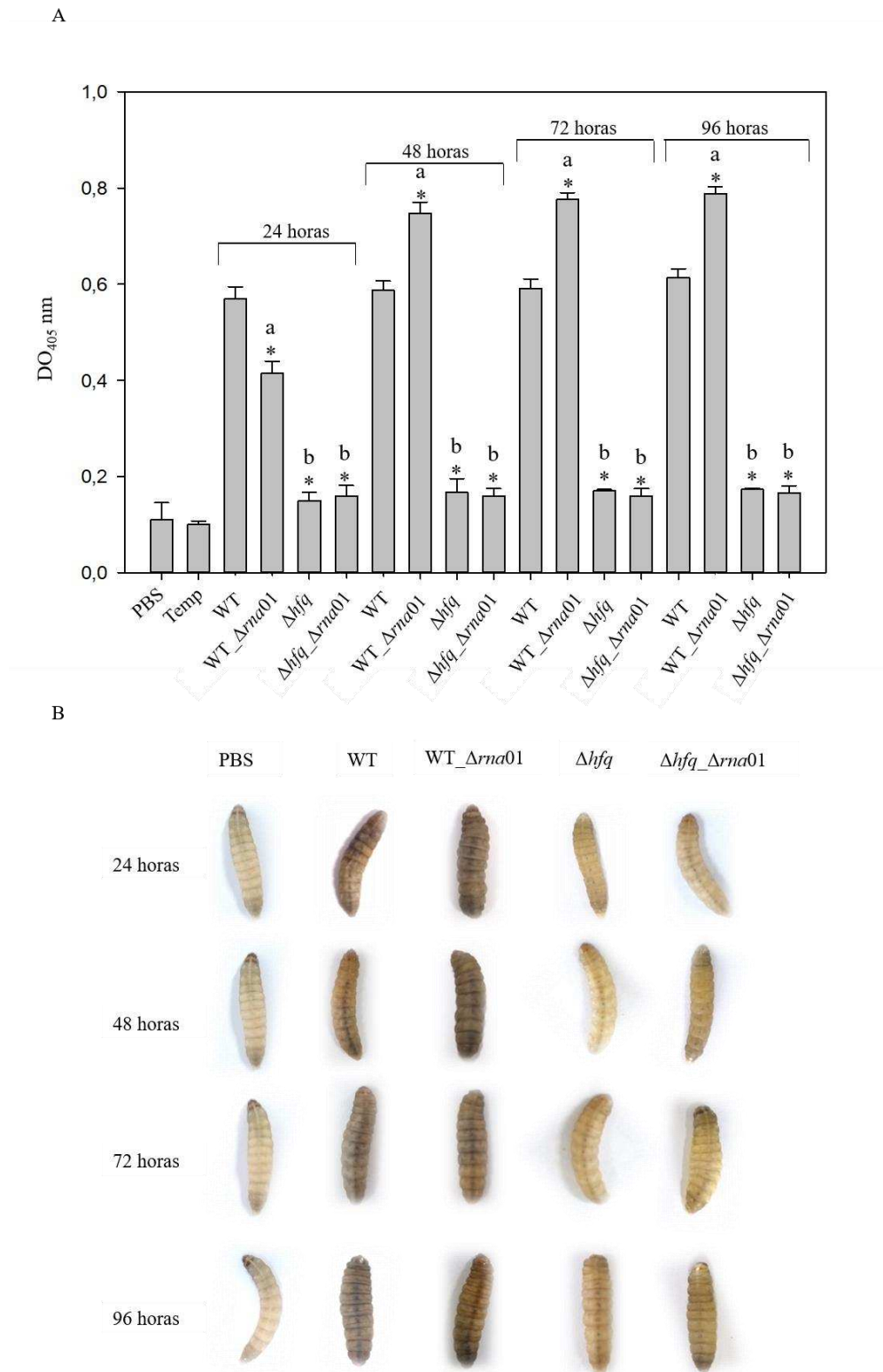


Figura 11: Avaliação da melanização das larvas de *G. mellonella* infectadas pelas linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01. (A) Quantificação da melanização da hemolinfa de larvas de *G. mellonella* infectadas até 96 horas. (B) Perfil fenotípico das larvas infectadas e não infectadas ao longo de 96 horas. As médias dos valores encontrados nas leituras, foram comparadas por ANOVA.

6.9 Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7

Com o intuito de avaliar o potencial de ativação de macrófagos pelas linhagens de App 2331, a produção de óxido nítrico (NO) foi determinada após 48 horas de sua inoculação em macrófagos RAW 264.7. As linhagens bacterianas foram adicionadas na mesma proporção de macrófagos (1:1). Os resultados mostram maior produção de NO para linhagem selvagem (WT), seguida da produção estimulada pela linhagem WT_Δ*rna01* e posteriormente, pelas linhagens WT_Δ*hfq* e Δ*hfq*_Δ*rna01*, nessa ordem (Figura 12).

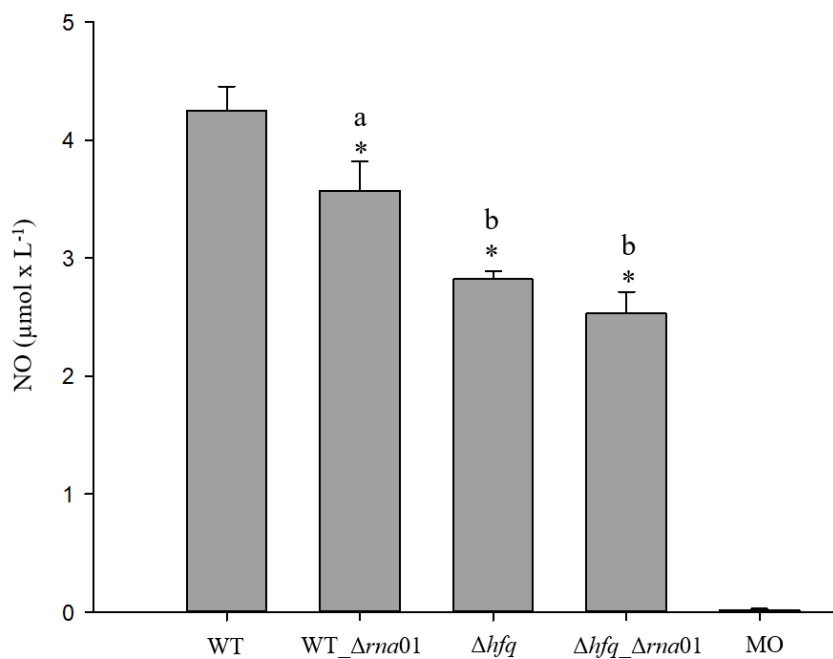


Figura 12: Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados com linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq*_Δ*rna01*. As médias foram comparadas por ANOVA. Grupos que compartilham a mesma letra não mostraram diferença estatística significativa pelo teste de Tukey 5%. *grupos que mostraram diferença em relação ao controle positivo (WT) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0.05$). MO: macrófagos RAW 264.7 não infectados.

6.10 Taxa de infecção e número de bactérias por macrófagos infectados

A linhagem selvagem WT apresentou uma taxa de infecção de 64% dos macrófagos. O mutante WT_Δ*rna01*, foi capaz de infectar 48 %. Aproximadamente cerca de 24 % e 22 % dos macrófagos foram infectados pelos mutantes Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01*, respectivamente (Figura 13A). Foram encontrados em média, 18 bactérias por macrófago infectado para a linhagem WT e 12 para o mutante WT_Δ*rna01*. Já, para os mutantes Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01*, 8 e 6 bactérias por macrófago infectado, respectivamente. Observaram-se muitas bactérias fora dos macrófagos para as linhagens Δ*hfq* e Δ*hfq_Δrna01* após 48 horas de infecção (Figura 13B). A linhagem WT_Δ*rna01*, apesar de estar em maior quantidade dentro dos macrófagos em relação aos outros mutantes, ainda sim, foi encontrada fora dos macrófagos (Figura 13B).

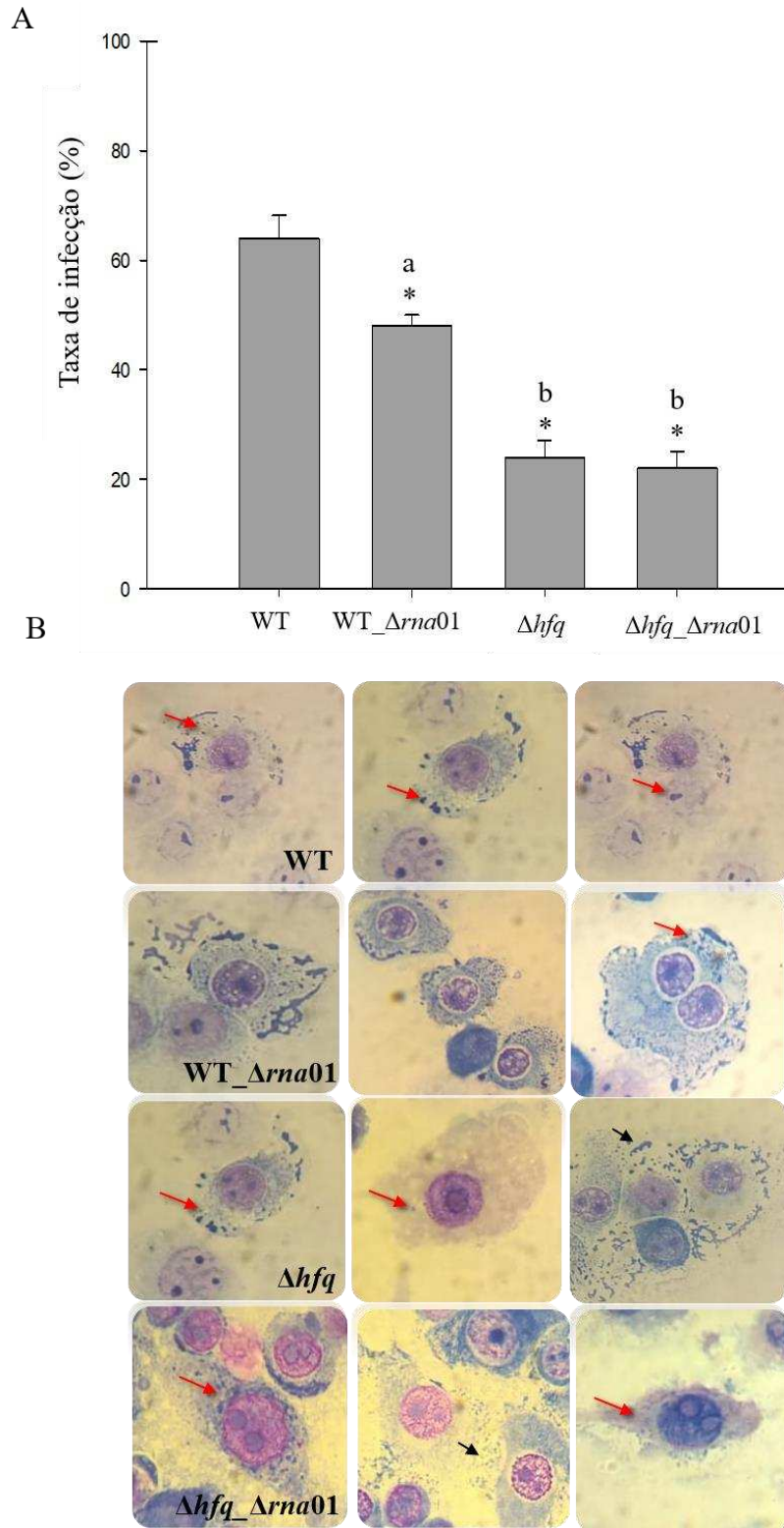


Figura 13: Taxa de macrófagos infectados com linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01. (A) Taxa (%) de infecção. (B) Microscopia óptica para detecção de bactérias dentro e fora dos macrófagos. As setas vermelhas mostram bactérias internalizadas e as setas pretas mostram bactérias não internalizadas pelos macrófagos.

6.11 Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias

A análise da produção de citocinas IL-6, IL-12, IL-4, IL-10 e TNF- α , produzidas por macrófagos RAW 264.7 infectados com as linhagens de *A. pleuropneumoniae* (proporção 1:1) investigadas foi realizada após 48 horas.

Macrófagos infectados com a linhagem WT_ Δ rna01 produziram altos níveis de IL-6, mostrando diferença significativa ($p \leq 0.05$), pelo teste *t*, em relação à linhagem WT e o controle negativo (macrófagos sem bactéria). O mesmo perfil não foi obtido quando macrófagos foram infectados com a linhagem Δ hfq_ Δ rna01, na qual houve uma diminuição significativa na produção de IL-6 (Figura 14). A linhagem WT_ Δ rna01 estimulou a produção de aproximadamente 3X mais IL-6 do que as demais linhagens investigadas revelando seu elevado potencial em gerar resposta inflamatória.

Em relação à produção de TNF- α , macrófagos infectados com a linhagem WT_ Δ rna01 mantiveram os níveis de produção iguais à linhagem parental WT ($p \leq 0.05$). No entanto, a produção de TNF- α para Δ hfq e Δ hfq_ Δ rna01 foi menor em relação a WT. Os níveis de IL-12 foram diminuídos na presença das linhagens mutantes WT_ Δ rna01 e Δ hfq_ Δ rna01, comparado à linhagem WT ($p \leq 0.05$) sendo este último, mostrando o mesmo nível de produção que macrófagos utilizados como controle, evidenciando nenhum estímulo. A produção de IL-12 para Δ hfq, mostrou-se equivalente à linhagem WT.

Macrófagos infectados com a linhagem mutante WT_ Δ rna01 apresentaram maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em relação à linhagem WT ($p \leq 0.05$). O contrário foi observado para as linhagens Δ hfq e Δ hfq_ Δ rna01, com menor produção de IL-10 comparadas ao selvagem ($p \leq 0.05$). No entanto, a produção da citocina anti-inflamatória IL-4 estimulada pelos mutantes WT_ Δ rna01 e Δ hfq não diferiu em relação à estimulação pela linhagem selvagem (WT). Somente na presença da linhagem mutante Δ hfq_ Δ rna01 houve diminuição de IL-4.

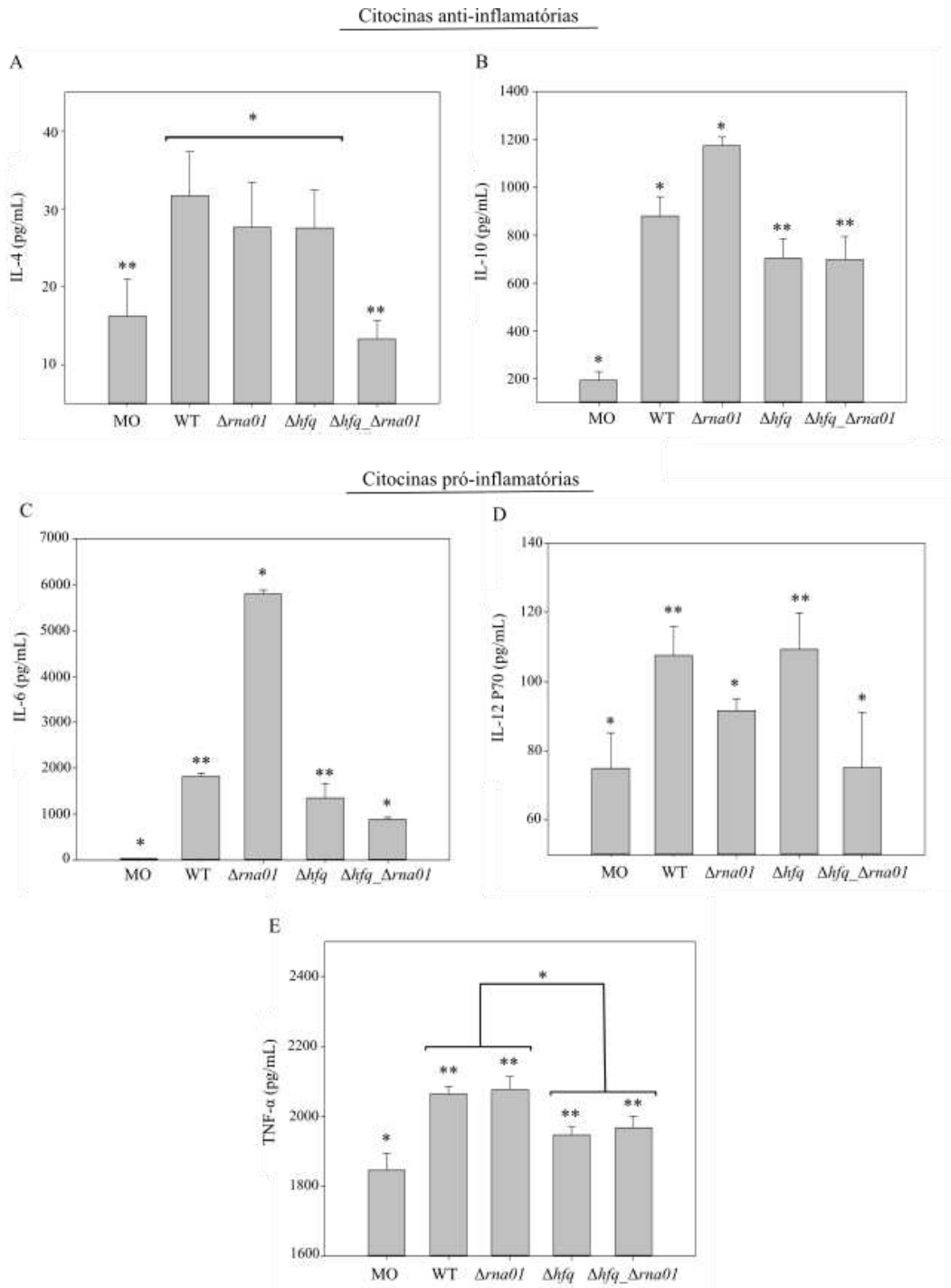


Figura 14: Produção das citocinas pró e anti-inflamatórias por macrófagos RAW 264.7 infectados com linhagens de *A. pleuropneumoniae* WT, WT_Δrna01, Δhfq e Δhfq_Δrna01. (A) Produção de IL-10. (B) Produção de IL-4. (C) Produção de IL-6. (D) Produção de IL-12 P70 e (E) Produção de TNF- α . O teste *t* de Student (5%) foi usado para comparar a produção das citocinas produzidas pelos macrófagos na presença das linhagens bacterianas mutantes investigadas em relação ao selvagem (WT) e ao controle negativo. *grupos ou tratamentos que mostraram diferença estatística em relação aos outros ($p \leq 0.05$). **grupos ou tratamentos que mostraram ser estatisticamente iguais ($p \leq 0.05$).

7. DISCUSSÃO

Atualmente existe um novo paradigma no entendimento da expressão gênica na interação patógeno-hospedeiro: o envolvimento de RNAs pequenos reguladores no processo (NUSS et al., 2017). Em relação a patógenos bacterianos de importância veterinária da família Pasteurellaceae, como App, existem poucos estudos que investigam a regulação da expressão gênica por RNAs pequenos.

Em *A. pleuropneumoniae*, o patógeno da pleuropneumonia suína, já foram identificados e confirmados RNAs pequenos reguladores (Rossi et al., 2016) e, entre estes, seis foram selecionados por Sanches (2018) para construção de mutantes com a finalidade de avaliar suas características funcionais. Alguns mutantes apresentaram alterações fenotípicas que indicam possibilidade de serem promissoras para o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas, entre eles a linhagem WT_Δ*rna01*, na qual se mantém o *background* da linhagem de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 MIDG 2331 tipo-selvagem com apenas a deleção do gene que codifica o sRNA *rna01*. Deste modo, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o papel funcional do sRNA Rna01 na virulência de App e o potencial da linhagem mutante WT_Δ*rna01* como vacina viva atenuada.

O pequeno Rna01 apresenta 86 nucleotídeos orientados sob a fita negativa e flanqueado pelos genes *sbcB* (*upstream*) e *eriC* (*downstream*). Como demonstrado anteriormente por Rossi (2015), o Rna01 é dependente da proteína Hfq, uma vez que, na ausência desta proteína não foi identificada a expressão do mesmo, tanto em condições de aerobiose quanto de anaerobiose. A predição de alvos para o sRNA01 mostrou mRNAs relacionados ao metabolismo de aminoácidos, síntese e metabolismo de carboidratos, cofatores de vitaminas e lipídios (SANCHES, 2018).

Para restaurar o fenótipo selvagem na linhagem WT_Δ*rna01*, foi utilizada a técnica PCR *overlapping extension* (OE) proposta por SHEVCHUK e colaboradores (2004). A técnica funcionou como esperado, no entanto, não foi possível obter a linhagem Δ*Rna01C*. Várias tentativas foram realizadas, no entanto, sem sucesso. Como não houve aparecimento de colônias transformantes no meio seletivo contendo cloranfenicol, sugere-se que não houve possivelmente entrada do DNA ou recombinação do cassete no genoma da linhagem hospedeira, no caso WT_Δ*rna01*. Sendo assim, serão necessários novos estudos para confirmar o papel de sRNA Rna01 na transformação natural de App e ainda estabelecer novos métodos para restaurar o fenótipo selvagem, como por exemplo, utilização de vetores de clonagem compatíveis com App.

Actinobacillus pleuropneumoniae é uma bactéria fastidiosa, capaz de crescer *in vitro* apenas em BHI acrescido de NAD, um meio rico que oferece todos os nutrientes necessários para seu crescimento. Portanto, a alteração na velocidade máxima de crescimento μ (h^{-1}) da linhagem mutante WT_ Δ rna01 indica que o sRNA Rna01 está envolvido na regulação de funções vitais no metabolismo primário da bactéria. A análise *in silico* de predição de alvos do Rna01 feita por Sanches (2018), identificou alvos com funções relacionadas às vias metabólicas centrais e componentes estruturais de membrana, como proteínas e lipídeos. A diferença observada no μ (h^{-1}) da linhagem WT_ Δ rna01, corrobora esta hipótese, uma vez que genes importantes relacionados ao metabolismo de App e divisão celular são alvos potenciais da regulação por Rna01.

Curiosamente, a linhagem selvagem WT mostrou duas possíveis fases exponenciais quando cultivada em meio BHI/NAD, mostradas na figura 3B. Observa-se maior inclinação na curva nos primeiros 40 minutos (primeira fase exponencial) e posteriormente, diminuição de inclinação (segunda fase exponencial) até atingir o crescimento máximo (figura 3B). Esses resultados sugerem o consumo de dois substratos sequencialmente, separados por uma fase intermediária (DERLINDEN et al., 2007). Pelo alto teor de nutrientes, como proteínas e açúcares, algumas bactérias cultivadas em caldo BHI podem apresentar um padrão de crescimento asigmoidal, como ocorre em *Escherichia coli* (DERLINDEN et al., 2007). Contudo, novos estudos devem ser realizados para investigar o possível crescimento diáuxico apresentado pela linhagem selvagem WT. No entanto, para as linhagens mutantes investigadas WT_ Δ rna01, Δ hfq e Δ hfq_ Δ rna01 este comportamento não foi observado, sugerindo o papel do Rna01 e a proteína Hfq na regulação do crescimento e na regulação da utilização preferencial de carboidratos por App.

Na literatura existem alguns relatos de sRNAs bacterianos que controlam processos de regulação da utilização de fontes de carbono, ou seja, em repressão catabólica (DURICAMITIC et al., 2018). O produto do gene *malt* foi identificado por Sanches (2018) como um dos alvos para o Rna01. MalT, é uma proteína reguladora que participa do transporte e metabolismo de maltose e maltodextrinas, já descrita para *Escherichia coli* (DIPPEL et al., 2005) e App sorotipo 1 (LONE et al., 2009). A linhagem mutante para o gene *malt* em App sorotipo 1 mostrou diminuição na velocidade máxima de crescimento em relação ao parental quando cultivadas em BHI acrescido de NAD (LONE et al., 2009). De forma hipotética sugerimos que Rna01 tenha como alvo o mRNA da proteína reguladora de maltose (MalT), o qual já foi predito *in silico* (SANCHES, 2018), e tenha papel na estabilização do mRNA de *malt*, auxiliando seu processo de tradução. Uma vez que o mutante WT_ Δ rna01 não expressa o Rna01, a utilização

da maltose e outros açúcares que não glicose é comprometida, o que ocasiona a redução do μ (h^{-1}) em relação ao WT.

Lone e colaboradores (2009), ressalta a provável função do regulon da maltose na obtenção de nutrientes, na saliva e orofaringe, durante o contato inicial com o hospedeiro. Os genes do regulon da maltose estão em todos os sorotipos de App e patógenos relacionados da família Pasteurellaceae, como *Mannheimia haemolytica* e *Haemophilus parasuis*, sugerindo que o metabolismo de carboidratos mediado por esse regulon possa desempenhar papel na persistência e/ou até mesmo na virulência de patógenos respiratórios de suínos (LONE et al., 2009). Assim temos mais um forte indício do envolvimento de RNAs pequenos reguladores na patogenicidade de App.

A linhagem $\Delta hfq_{\Delta rna01}$ não mostrou diminuição no μ (h^{-1}), o que evidencia uma regulação possivelmente muito mais complexa com envolvimento de diversos fatores. A curva de crescimento com DO_{600} inicial de 0,01 (dados não mostrados) evidenciou uma fase lag, não visualizada com a DO inicial de 0,1, e este duplo mutante requereu um tempo muito maior para atingir a fase logarítmica quando comparada às linhagens WT e Δhfq .

A ausência do sRNA Rna01 diminuiu a adesão *in vitro* de App. O mesmo ocorreu com as linhagens mutantes Δhfq e $\Delta hfq_{\Delta rna01}$. A chaperona Hfq está envolvida no processo de formação de biofilme em App sorotipo 1 pela regulação dos níveis de expressão dos genes *pgaC* e *dspB*, e os produtos destes estão envolvidos na promoção do desenvolvimento da matriz de polissacarídeos e dispersão das células do biofilme, respectivamente (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013). A ausência de Hfq afeta a formação e dispersão de biofilme em outros patógenos como *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora* e *Xanthomonas axonopodis*, (KULESUS et al., 2008; ZENG et al., 2013; LIU et al., 2019).

Os níveis de adesão do mutante WT $\Delta rna01$ diminuíram mesmo na presença da proteína Hfq, sugerindo o papel positivo do Rna01 no processo de adesão em App. Assim como possivelmente Rna01 em App, outros sRNAs como RsmY e RsmZ regulam positivamente a formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*. Esses sRNAs são regulados pela exonuclease PNPase pelo processamento do transcrito. Mutantes de *P. aeruginosa* para essa exonuclease aumentam os níveis de RsmY e RsmZ, o que resulta em diminuição na formação de biofilme (CHEN et al., 2016; CHEN et al., 2019).

Em análises de predição de alvos *in silico*, o gene *smpA* foi identificado como sendo regulado por Rna01 (SANCHES, 2018). A lipoproteína SmpA participa do complexo YaeT em *E. coli* e promove manutenção/estabilidade do complexo, além disso, a linhagem mutante para *smpA* mostrou defeitos na montagem de proteínas integradas à membrana externa (do inglês,

outer-membrane proteins - OMPs) (SKLAR et al., 2007). Em *P. aeruginosa*, OmlA é uma proteína homóloga a SmpA responsável pela integridade do envelope celular (OCHSNER et al., 1999). A presença de OMPs é um importante fator ligado a adesão (BUJOLD; MACINNES, 2015) e possivelmente regulado por sRna01 em App. Desta forma, os resultados obtidos *in silico* por Sanches (2018) e os resultados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese de que o Rna01 tem papel funcional importante na virulência de App, regulando importantes fatores de virulência e crescimento e influenciando na regulação do metabolismo da bactéria, inclusive na resposta a condições ambientais, como na produção de vesículas de membrana externa (OMVs) ou vesículas externas (EVs).

Vesículas extracelulares produzidas por bactérias têm importante função na interação célula-célula e podem ser relacionadas nos processos de comunicação inter e intracelulares, transferência horizontal de genes (HTG), resistência a antibióticos e modulação da resposta imune do hospedeiro (DAUROS SINGORENKO et al., 2017; JAN, 2017).

Neste trabalho, as linhagens mutantes WT_Δ*rna01*, Δ*hfq* e Δ*hfq*_Δ*rna01* mostraram uma redução relativa na produção de EVs após 8 horas de crescimento, o que sugere o envolvimento de Rna01 na produção de EVs. Como para atividade deste sRNA há necessidade da estabilização por Hfq, os dois resultados confirmam o envolvimento deste sRNA na estruturação da membrana e na parede celular. A predição de alvos para o Rna01 determinada por Sanches (2018) aponta mRNAs responsáveis pela síntese de peptideoglicano (gene *plcC*) e metabolismo/biossíntese de fosfolípidos (gene *uppS*). Desde modo, sugerimos que o sRNA01 juntamente a chaperona Hfq regulam o processo de biossíntese de peptideoglicano e fosfolípidos afetando a vesiculação em App. As imagens obtidas por MET, mostram pequenas diferenças nas EVs dos mutantes wt_Δ*rna01* e Δ*hfq*_Δ*rna01*, com forma mais homogênea e diminuição no tamanho comparada a linhagem selvagem. Portanto, sugerimos que além de regular a produção de EVs, o sRNA01 possa alterar o tamanho e o conteúdo proteico (Figura 5) das EVs produzidas por App.

Recentemente foi relatado para *Haemophilus influenza* que a deleção ou baixa expressão dos genes de *vacJ* e *yrb* gera acúmulo de fosfolípidos na membrana externa, aumentando a vesiculação sem comprometer a integridade da membrana (ROIER et al., 2016; GILL et al., 2018). Além disso, a biossíntese exacerbada de peptideoglicano afeta a formação de EVs (MCBROOM et al., 2006). Desta forma, de um modo geral alterações estruturais na membrana e parede celular podem desencadear hipervesiculação como em *H. influenzae*.

Neste trabalho, a virulência das linhagens mutantes foi testada em *Galleria mellonella*, um modelo comumente utilizado por esse organismo apresentar sistema imune inato e células

da hemolinfa capazes de encapsular e fagocitar microrganismos invasores, além de respostas adaptativas existentes, como a produção induzida de lisozima e pequenos peptídeos antimicrobianos. Este modelo foi validado e é funcional em App (RAMARAO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). Deste modo, por apresentar alto grau de homologia funcional com o sistema imune inato de mamíferos, *G. mellonella* pode ser utilizada como modelo alternativo de infecção (LIONAKIS, 2011; BLANCO et al., 2017). Além das características iniciais de resposta a microrganismos invasores, as larvas de *G. mellonella* se mantêm ativas fisiologicamente a 37 °C, temperatura ótima de muitos patógenos, como App. Assim, em *G. mellonella* foi possível verificar que nas linhagens que não apresentam Rna01, a virulência foi substancialmente atenuada.

Assim, para melhor compreensão da resposta de *G. mellonella* contra as linhagens de App estudadas neste trabalho, o sistema de melanina-fenoloxidase (PO), um componente da resposta humoral em *G. mellonella*, responsável pela melanização da hemolinfa e eliminação de microrganismos invasores, foi investigado (ZDYBICKA-BARABAS et al., 2014). A ativação do sistema de melanina-fenoloxidase está associada com níveis de melanização da hemolinfa em larvas infectadas. Geralmente, patógenos capazes de causar maior mortalidade em larvas de *G. mellonella* desencadeiam altos níveis de melanização quando comparados com linhagens menos virulentas, como mostrado neste estudo e por outros trabalhos (WAND et al., 2013; JORJÃO, 2016). No entanto, os resultados de melanização encontrados neste trabalho não mostraram uma correlação direta com a mortalidade das larvas, uma vez que a linhagem WT_Δ*rna01* resultou em maior índice de sobrevivência de larvas infectadas e intensa melanização após 48 horas de infecção.

Por outro lado, foi observado que larvas inoculadas apenas com EVs produzidas pela linhagem WT_Δ*rna01* apresentaram menor sobrevivência quando comparadas com às outras linhagens mutantes e a linhagem selvagem WT. Todas as larvas inoculadas com EVs mostraram intensa melanização após 30 minutos de inoculação. O intenso efeito na melanização de larvas inoculadas com EVs pode ser causado por constituintes de membrana externa de bactérias Gram-negativas, como LPS e proteínas (SEITZ et al., 2003). O mRNA do gene da lipídeo-A-dissacarídeo sintetase (*lpxB*), responsável pela síntese de lipídeo A de LPS é alvo de regulação pelo Rna01 como identificado *in silico* por Sanches, (2018). Desta forma, é possível relacionar os resultados obtidos com possíveis alterações no conteúdo de LPS, via regulação por Rna01, o que pode ter desencadeado a alteração do perfil de proteínas encontradas nas EVs produzidas por WT_Δ*rna01*.

A resposta do hospedeiro a patógenos bacterianos envolve a estimulação de macrófagos, culminando na secreção óxido nítrico (NO) e citocinas que orquestram eventos humorais e celulares (HAYAKAWA, 2005). A produção de NO e citocinas por macrófagos ativados pode ser considerada o mecanismo primário de defesa contra patógenos (HAYAKAWA, 2005). A progressão da PPS induz lesões no sistema respiratório e inflamação aguda (SASSU et al., 2017) e Cho e Chae (2004) determinaram a expressão de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO), em suínos infectados com App e observaram que o aumento progressivo das lesões pulmonares é acompanhado pelo aumento na concentração de NO nos tecidos. Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α encontraram-se em concentrações elevadas em tecidos hospedeiros e cultura de macrófagos infectados com App (HSU et al., 2016). Müllbner e colaboradores (2018) demonstraram que a fase aguda da PPS é caracterizada por elevada resposta pró-inflamatória com produção de IL-17A e lesões do tecido pulmonar e, a fase crônica é caracterizada pela persistência de App nas tonsilas devido à intensa produção de IL-10, uma citocina imunossupressora da resposta inflamatória.

Dada a importância da resposta imune celular no desenvolvimento da PPS, investigamos a produção de citocinas por macrófagos infectados com as linhagens mutantes e selvagem. As linhagens mutantes apresentaram perfil de produção de citocinas e NO diferentes da linhagem parental. A citocina TNF- α tem efeito ativador em macrófagos, com ação autócrina. Os mutantes Δhfq e $\Delta hfq_{\Delta rna01}$ mostraram baixa produção de TNF- α em relação à linhagem selvagem WT, sugerindo baixa ativação de macrófagos em infecção por esses mutantes. Além disso, esses mutantes mostraram diminuição na produção de NO e a microscopia óptica realizada mostrou que as células dessas linhagens estavam em maior quantidade fora dos macrófagos. Desta forma, associa-se que a baixa produção de NO pelas linhagens mutantes está relacionada à baixa taxa de infecção e menor número de bactérias por macrófagos infectados, e não pelo fato das linhagens mutantes regular a produção de NO pelos macrófagos. Esses resultados podem estar correlacionados à diminuição da adesão das linhagens mutantes em superfície abiótica. Contudo, os mutantes Δhfq e $\Delta hfq_{\Delta rna01}$ não são capazes de estimular a ativação de macrófagos em comparação à linhagem selvagem.

Apesar da diminuição na adesão, menor taxa de infecção e menor número de bactérias por macrófagos infectados em relação a linhagem parental, o mutante para o sRNA Rna01 não alterou a produção de TNF- α em relação à linhagem selvagem WT. Deste modo, *in vitro*, podemos afirmar que o mutante WT- $\Delta rna01$ é capaz de manter a ativação de macrófagos. Além disso, as bactérias que permaneceram fora dos macrófagos podem ter importante papel na resposta imune humoral, a qual não foi investigada neste trabalho. Resultados semelhantes

foram obtidos por Yuan e colaboradores (2018) para App mutante SLW07 (sorotipo 1) testado como vacina viva atenuada. Os autores observaram que as mutações relacionadas aos genes das toxinas Apx e o gene *arcA* afetam a capacidade de adesão da linhagem e consequentemente, menor taxa de fagocitose em relação à linhagem selvagem. Apesar disso, o mutante foi capaz de manter a produção de TNF- α e IL-6 em camundongos infectados.

O perfil de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α para o mutante WT_ Δ *rna01*, foi equivalente à linhagem selvagem, no entanto, os níveis de IL-6 foram aumentados cerca de 3 vezes. Componentes de membrana externa de bactérias-Gram negativas, como LPS, são capazes de desencadear resposta imune no hospedeiro (SELVARAJ et al., 2015). Li e colaboradores (2018) mostraram que LPS produzidos por App são capazes de ativar macrófagos via receptores *Toll-Like-4* (TLR-4) desencadeando a cascata dependente de MyD88 e ativando NF κ -B que, por sua vez, regula positivamente genes responsáveis pela resposta inflamatória (IL-6, TNF- α e IL-1 β) no hospedeiro. Deste modo, nossos resultados sugerem que o aumento nas concentrações de IL-6 pode estar relacionado a uma possível alteração na síntese e/ou estrutura da porção de lipídeo A em LPS produzidos pelo mutante WT_ Δ *rna01*.

Interleucina-6 é uma citocina capaz de desempenhar funções como síntese de proteínas de fase aguda, indução de IL-10, diferenciação de células do tipo Th17 e indução da produção de anticorpos por células B. A resposta imune gerada pelo tipo celular Th17 têm importante função na defesa do hospedeiro contra infecções por bactérias extracelulares principalmente, contra bactérias Gram-negativas (GRAEBER; OLSEN, 2012). As células T auxiliares do tipo 17 (Th17) são linhagens de células T que produzem as citocinas IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22 (LIN et al., 2010). Muitos trabalhos mostram que IL-17 tem função importante na imunidade induzida por vacinas vivas atenuadas contra infecções bacterianas por recrutar células protetoras Th1, neutrófilos, macrófagos e possível indução de antimicrobianos que auxiliam na morte do patógeno (PRIEBE et al., 2008; ZHANG et al., 2009). Portanto, o direcionamento para IL-17 é uma resposta importante a vacinas vivas atenuadas contra infecções bacterianas (LIN et al., 2010). Assim, a linhagem WT_ Δ *rna01* é capaz de estimular a resposta inflamatória *in vitro*, aumentando a produção de IL-6 sugerindo, possível diferenciação de células Th17 e estímulo da resposta imune humoral *in vivo*.

O aumento da resposta inflamatória no hospedeiro a partir da colonização de App é considerado o fator principal para o aumento das lesões nos tecidos pulmonares durante a fase aguda da PPS (HSU et al., 2016). A ausência da citocina IL-10 durante a fase aguda da doença agrava as lesões nos tecidos pulmonares, já o aumento das concentrações dessa citocina na fase crônica, auxilia a persistência de App nas tonsilas (MÜLLEBNER et al., 2018). Sabe-se que

IL-10 é uma citocina reguladora da resposta inflamatória, responsável por manter o equilíbrio da resposta imune gerada pelo hospedeiro durante uma infecção. As linhagens Δhfq e Δhfq_Rna01 apresentaram concentrações de IL-10 inferiores à linhagem selvagem. Apesar de manter a produção de IL-6, esses mutantes não foram capazes de estimular resposta inflamatória *in vitro*.

As citocinas IL-12 e IL-4 controlam a diferenciação de células Th0. Células tipo Th0 se diferenciam em células Th1 (inflamatórias) ou Th2 de acordo com as citocinas liberadas durante o reconhecimento do antígeno. A produção de IL-4 durante a apresentação de antígeno a linfócitos T favorece a geração de células Th2. Por outro lado, a produção de IL-12 induz diferenciação para Th1. A diferença entre os tipos de resposta Th1 e Th2 são as citocinas produzidas pelas células T auxiliares. Citocinas produzidas por células Th1 promovem ativação de macrófagos, por exemplo pela ação do interferon gama (IFN- γ) induzindo produção de TNF- α por essas células. Células Th2 produzem IL-4, que auxilia no processo de ativação de células B, resultando na produção de anticorpos (COICO; SUNSHINE, 2010). De acordo com o padrão de citocinas produzidas *in vitro* por macrófagos infectados pela linhagem mutante WT_ $\Delta Rna01$, sugere-se que o mesmo seja capaz de manter ativação de macrófagos e por aumentar a produção de IL-6 possivelmente, induz a resposta do tipo Th17 *in vivo*. Já as linhagens Δhfq e Δhfq_Rna01 reduziram a ativação de macrófagos infectados deste modo, descartamos o potencial desses mutantes como vacina viva atenuada.

As análises *in vitro* realizadas neste trabalho evidenciaram que a linhagem mutante para o Rna01 pode ser um candidato a vacina viva atenuada pois apresentou um perfil de citocinas que nos sugere afirmar possível indução de resposta do tipo Th17 e Th1, o que não foi observado para as outras linhagens mutantes investigadas neste trabalho. No entanto, o sistema imune envolve uma complexa rede de regulação que vai além da resposta celular analisada neste trabalho. Por este motivo, são necessários novos testes para determinar o efeito conjunto das respostas imunes celular e humoral, podendo ser utilizados camundongos como modelo experimental.

Atualmente, a grande problemática na produção de vacinas vivas atenuadas para App é o desenvolvimento de uma linhagem que proteja contra colonização e morbidade de forma ampla a todos os 18 sorotipos descritos (CABRAL et al., 2017; ANTENUCCI et al., 2018; BOSSÉ et al., 2018). A organização do gene que codifica Rna01 e os genes flanqueadores foram encontrados no genoma de todos os sorotipos cujos genomas estão disponíveis no bancos de dados públicos, inclusive nos genomas de isolados clínicos circulantes no estado de Minas Gerais (1, 2, 3, 4, 5b, 7, 8 e 16), o que inclui sorotipos com alta atividade hemolítica e citotóxica

como o 1 e o 5b. Sabendo que o sRNA01 regula positivamente a virulência do sorotipo 8, sugere-se que o mesmo exerça o mesmo papel nos demais sorotipos, o que reforça o estabelecimento da linhagem WT_Δ*rna01* como um promissor candidato a vacina viva atenuada.

8. CONCLUSÕES

Este trabalho investigou a funcionalidade do Rna01 na virulência de *A. pleuropneumoniae* e o potencial da linhagem WT_Δrna01 como vacina viva atenuada. A ausência do Rna01 impacta negativamente no crescimento, adesão, produção de EVs e alteração no perfil proteico das EVs de *A. pleuropneumoniae in vitro*. Além disso, a linhagem mutante WT_Δrna01 mostrou atenuação em *G. mellonella* e o perfil de citocinas produzidas por macrófagos infectados sugerem possível resposta do tipo Th17 e Th1. Deste modo, concluímos que o Rna01 regula positivamente a virulência de *A. pleuropneumoniae* e a linhagem mutante WT_Δrna01 pode ser um promissor candidato a vacina viva atenuada pois, apresentou uma resposta celular promissora *in vitro*. No entanto, o sistema imune envolve uma complexa rede regulação que vai além da resposta celular analisada neste trabalho sendo assim, necessários testes *in vivo* para determinar o efeito conjunto da resposta imune celular e humoral.

REFERÊNCIAS

- AUGER, E., DESLANDES V., RAMJEET M., CONTRERAS I., NASH J.H.E., HAREL J., et al. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.77, n.4, p.1426-1441, 2009.
- ANTENUCCI, F., FOUGEROUX, C., BOSSÉ, J.T., MAGNOWSKA, Z., ROESCH, C., LANGFORD, P., HOLST, P.J., BOJESSEN, A.M. Identification and characterization of serovar-independent immunogens in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Research**, v.48, n.74, p.2-12, 2017.
- ANTENUCCI, F., FOUGEROUX, C., DEENEY, A., ORSKOV, C., RYCROFT, A., HOLST, P.J., BOJESSEN, A.M. *In vivo* testing of novel vaccine prototypes against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Research**, v.49, n.1, p.1-11, 2018.
- Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora da Carne Suína (Abipecs). 2018. <http://www.abipecs.org.br/> acessado em 07/08/2018
- BÉLANGER, M., DUBREUIL, D., JACQUES, M. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.62, n.3, p.868-873, 1994.
- BITTO, J. N., CHAPMAN, R., PIDOT, S., COSTIN, A., LO, C., CHOI, J., D'CRUZE, T., REYNOLDS, E. C., DASHPER, S. G., TURNBULL, L., WHITCHURCH, C. B., STINEAR, T. P., STACEY, K. J., FERRERO, R. L. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. **Scientific Reports**, v.7, n.7072, p.1-11, 2017.
- BOEKEMA, B. K. H. L., VAN PUTTEN, J. P. M., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N., SMITH, H. E. Host cell contact induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.691-700, 2004.
- BOSSÉ, J. T., GILMOUR, H. D., MACINNES, J. I. Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal Bacteriology**, v.183, n.3, p.1242-1247, 2001.
- BOSSÉ, J. T., JANSON, H., SHEEHAN, B. J., BEDDEK, A. J., RYCROFT A. N., KROLL, S., LANGFORD, P. R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. **Microbes and Infection**, v.4, n.5, p.225-235, 2002.
- BOSSÉ, J. T., SINHA, S., SCHIPPERS, T., KROLL, J. S., REDFIELD, R. J., LANGFORD, P. R. Natural competence in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.298, n.1, p.124-130. 2009
- BOSSÉ, J. T., SOARES-BAZZOLLI, D. M., LI, Y., WREN, B. W., TUCKER, A. W., MASKELL, D. J., RYCROFT, A. N., LANGFORD, P. R. 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.1-6, 2014.
- BOSSÉ, J. T., LI, Y., ATHERTON, T. G., WALKER, S., WILLIAMSON, S. M., ROGERS, J., CHAUDHURI, R. R., WEINERT, L. A., HOLDEN, M. T. G., MASKELL, D. J., TUCKER,

A. W., WREN, B. W., RYCROFT, A. N., LANGFORD, P. R. Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v. 178, p. 279-282, 2016.

BOSSÉ, J. T., LI, Y. S., SRKZI, R., FODOR, L., LACOUTURE, S., GOTTSCHALK, M., AMORIBIETA, M. C., ANGEN, O., NEDBALCOVA, K., HOLDEN, M. T. G., MASKELL, D. J., TUCKER, A. W., WREN, B. W., RYCROFT, A. N., LANGFORD, P. R. Proposal of serovars 17 and 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on serological and genotypic analysis, **Veterinary Microbiology**, v.217, n.4, p.1-6, 2018.

BUETTNER, F. F. R., BENDALLAH, I. M., BOSSÉ, J. T., DRECKMANN, K., NASH, J. H. E., LANGFORD, P. R., GERLACH, G. F. Analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* *ArcA* regulon identifies fumarate reductase as a determinant of virulence. **Infection and Immunity**, v.76, n.6, p.2284-2295, 2008.

BUJOLD, A. R., MACINNES, J. I. Identification of putative adhesins of *Actinobacillus suis* and their homologues in the other members of the Family Pasteurellaceae. **BMC Research Notes**, v.8, n.1, p.675-682, 2015.

BLANCO, L. A. A., CRISPIM, J. S., FERNANDES, K. M., OLIVEIRA, L. L., PEREIRA, M. F., BAZZOLLI, D. M. S., MARTINS, G. F. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell and Tissue Research**, v. 370, n. 1, p. 153-168, 2017.

BLACKALL, J.P., KLAASEN, H.L.B.M., VAN DEN BOSCH, H., KUHNERT, P., FREY, J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. **Veterinary Microbiology**, v.84, n.2, p.47-52, 2002.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistics Notes: Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **British Medical Journal**, v.317, n. 7172, p. 1572–1580, 1998.

BROGAARD, L., KLITGAARD, K., HEEGAARD, P. M. H., HANSEN, M. S., JENSEN, T. K., SKOVGAARD, K. Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 417, 2015.

CABRAL, M. P., GARCIA, P., BECEIRO, A., RUMBO, C., PERÉZ, A., MOSCOSO, M., BOU, G. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. **Nature Communications**, v.8, n.15480, p.1-17, 2017.

COELHO, A. C., VIEIRA-BRITO, F. J., VIEIRA-BRITO, M. G., RODRIGUES, J. Pleuropneumonia suína causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*- diagnostico e estratégias de controlo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n.552, p.193-198, 2004.

COICO, R., SUNSHINE, G. **Imunologia**. 6º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

COSTA, B. L. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros**. 2017. 56 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, 2017

CHAO, Y., VOGEL, J. The role of Hfq in bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, n.1, p.24-33, 2010.

CHEN, R., WENG, Y., ZHU, F., JIN, Y., LIU, C., PAN, X., et al. Polynucleotide phosphorylase regulates multiple virulence factors and the stabilities of small RNA RsmY/Z in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n.2, p.75-87, 2016.

CHEN, R., WEI, X., LI, Z., WENG, Y., XIA, Y., REN, W., WANG, Z., JIN, Y., BAI, F., CHENG, Z., JIN, S., WU, W. Identification of a small RNA that directly controls the translation of the quorum signal synthase gene *rhll* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental microbiology**, 2019.

CHIEN, M. S. et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v.30, n.3-4, p. 327-333, 2009.

CHIERS, K., De WAELE, T., PASMANS, F., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**, v.41, n.5, p.65-80, 2010.

CHO, W. S., CHAE, C. Expression of Nitric Oxide Synthase 2 and Cyclooxygenase-2 in Swine Experimentally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Pathology**, v.41, n.6, p.666-672, 2004.

CRISPIM, J. S. **Envolvimento da chaperona Hfq na virulência de *Actinobacillus pleuropneumoniae***. 2014. 62 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

CRUIJSEN, T., VAN LEENGOED, L. A. M. G., KAMP, E. M., HUNNEMAN, W. A., RIEPEMA, K., BARTELSE, A., VERHEIJDEN, J. H. M. Prevalence and development of antibodies neutralizing the haemolysin and cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in three infected pig herds. **Veterinary Quarterly**, v. 17, n. 3, p. 96-100, 1995.

DALAI, B., ZHOU, R., WAN, Y., KANG, M. S., LI, L., LI, T. T. Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v.46, n.3, p.128-134, 2009.

DAUROS SINGORENKO, P., et al. Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity. **Journal of Extracellular Vesicles**, v.6, p.1-14, 2017.

DECUADRO-HANSEN, G., WERLANG, J. WOLLMANN, E. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: uma nova visão no diagnóstico. **Acta Scientiae Veterinarian**, v.37, n.4, p.157-164, 2009.

DERLINDEN, E. V., BERNAERTS, K., VAN IMPE, J. F. Dynamics of *Escherichia coli* at elevated temperatures: effect of temperature history and medium. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.438-453, 2007.

DEVOS, S., VAN PUTTE, W., VITSE, J. et al. Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 10, p. 3930-3937, 2017.

DIPPEL, R., BERGMILLER, T., BÖHM, A., BOOS, W. The maltodextrin system of *Escherichia coli*: glycogen-derived endogenous induction and osmoregulation. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.24, p.8332-8339, 2005.

DURICA-MITIC, S., GOPEL, Y., GORKE, B. Carbohydrate utilization in bacteria: making the most out of sugars with the help of small regulatory RNAs. **Microbiology Spectrum**, v.6, n.2, p.1-13, 2018.

FOOTE, S. J., BOSSÉ, J. T., BOUEVITCH, A. B., LANGFORD, P. R., YOUNG, N. M., NASH, J. H. The complete genome sequence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 (serotype 5b). **Journal of Bacteriology**, v.190, n.4, p. 1495-1496, 2008.

FU, S., OU, J., ZHANG, M., XU, J., LIU, H., LIU, J., YUAN, F., CHEN, H., BEI, W. The live attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* triple-deletion mutant $\Delta apxIC\Delta apxIIC\Delta apxIV$ -ORF1 strain, SLW05, immunizes pigs against lethal challenge with *Haemophilus parasuis*. **Clinical Vaccine Immunology**, v.20, n.2, p.134-139, 2013.

FREY, J. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. **Trends in Microbiology**, v.3, n.7, p.257-261, 1995.

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.

GARDNER, I. A., BOSSÉ, J. T., SHELDRAKE, R. F., ROSENDAL, S., JOHNSON, R. P. Serological response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 infection in a commercial pig herd. **Australian veterinary journal**, v.68, n.11, p. 349-352, 1991.

GILL, S., CATCHPOLE, R., FORTERRE, P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, p.1-32, 2018. DOI: 10.1093/femsre/fuy042

GOTTSCHALK, M.; BROES, A. Actinobacillosis. In: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. (Ed.). **Diseases of Swine**. 11th. ed. [s.l.] Wiley-Blakwell, 2019. p.653-669.

GRAEBER, K. E., OLSEN, N. J. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. **Inflammation Research**, v.61, n.5, p.87-96, 2012.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods in Enzymology**, v.268, p.237-246, 1996.

HAYAKAWA, M. **Fagocitose, produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos estimulados por diferentes agentes de cromoblastomicose**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

HSU, C., LI, S. C., CHANG, N., CHEN, Z., LIAO, J., CHEN, T., WANG, J., LIN, L., HSUAN, S. Involvement of NF- κ B in regulation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI-induced proinflammatory cytokine production in porcine alveolar macrophages. **Veterinary Microbiology**, v.195, n.8, p.128-135, 2016.

IZANO, E. A., SODOVSKAYA, I., VINOGRADOV, E., MULKS, M. H., VELLIYAGOUNDER, K., RAGUNATH, C., KHER, W. B., RAMASUBBU, N., JABBOURI, S., PERRY, M. B., KAPLAN, J. B. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbial pathogenesis**, v.34, n.6, 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.

JACOBSEN, I., HENNIG-PAUKA, I., BALTES, N., TROST, M., GERLACH, G. F. Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.226-234, 2005.

JAN, A. T. Outer membrane vesicles (OMVs) of Gram-negative bacteria: A perspective update. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.1053, p.1-11, 2017.

JORJÃO, A. L. **Metodologia de criação de *Galleria mellonella* para uso como modelo de infecção e efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* inativado pelo calor *in vivo* e *in vitro*, desafiados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, SP, 2016.

KULESUS, R. R., DIAZ-PEREZ, K., SLECHTA, E. S., ETO, D. S., MULVEY, M. A. Impact of the RNA Chaperone Hfq on the Fitness and Virulence Potential of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.76, n.7, p.3019-3026, 2008.

KUSMIEREK, M., DERSCH, P. Regulation of host-pathogen interactions via the post-transcriptional Csr/Rsm system. **Current Opinion in Microbiology**, v.41, n.S1, p.58-67, 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, n.47, p.17-47, 2016.

LABRIE J., PELLETIER-JACQUES G., DESLANDES V., RAMJEET M., AUGER E., NASH J. H. E., JACQUES M. Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Research**, v.41, n.1, p.1-18, 2010.

LAPPANN, M., BECHER, D., VOGEL, U. Comparative proteome analysis of spontaneous outermembrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, v.195, n.19, p.4425-4435, 2013.

LEE, Y. J., MO, I. P., KANG, M. S. Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. **Avian Pathology**, v.34, n.4, p.362-366, 2005.

LI, B., FANG, J., ZUO, Z., YIN, S., HE, T., YANG, M., DENG, J., SHEN, L., MA, X. YU, S., WANG, Y., REN, Z. Activation of Porcine Alveolar Macrophages by *Actinobacillus*

pleuropneumoniae Lipopolysaccharide via the Toll-Like Receptor 4/NF-K-B-Mediated Pathway. **Infection and Immunity**, v.86, n.3, p.1-13, 2018.

LIONAKIS, M. S. Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v.2, n.6, p.521-527, 2011.

LIU, Q., GONG, Y., WEN, X., HUANG, Y., CAO, S. Construction e imunogenicity of a Δ *apxIC/ompP2* mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, n.80, n.1, p.15-31, 2013.

LIU, X., YAN, Y., ZHOU, C., WANG, X. Biological and transcriptomic studies reveal hfq is required for swimming, biofilm formation and stress response in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **BMC Microbiology**, v.19, n.103, p.1-9, 2019.

LOERA-MURO, V., JACQUES, M., TREMBLAY, Y., AVELAR-GONZÁLEZ, F., LOERA-MURO, A., RAMÍREZ-LÓPEZ, E., MEDINA-FIGUEROA, A., GONZÁLEZ-REYNAGA, H., GUERRERO-BARRERA, A. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms. **Microbiology**, v.159, n.3, p.536-544, 2013.

LOERA-MORO, A., ANGULO, C. New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Veterinary Microbiology**, v.217, n.42, p.66-75, 2018.

LONE, G. A., DESLANDES, V., NASH, J. H., JACQUES, M., MACINNES, J. I. *malt* knockout mutation invokes a stringent type gene-expression profile in *Actinobacillus pleuropneumoniae* in bronchoalveolar fluid. **BMC Microbiology**, v.9, n.195, p.1-15, 2009.

LIN, Y., SLIGHT, S. R., KHADER, S. A. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. In *Seminars in immunopathology*. **Springer-Verlag**, v.32, n.1, p.79-90, 2010.

PEREIRA, M. F., ROSSI, C. C., SEIDE, L. E., MARTINS FILHO, S., DE MELO DOLINSKI, C., BAZZOLLI, D. M. S. Antimicrobial resistance, biofilm formation and virulence reveal *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains' pathogenicity complexity. **Research in veterinary science**, v. 118, p. 498-501, 2018.

MELAMED, S., PEER, A., FAIGENBAUM ROMM, R., GATT, Y. E., REISS, N., BAR, A., ALTUVIA, Y., ARGAMAN, L., MARGALIT, H. Global mapping of small RNA target interactions in bacteria. **Molecular Cell**, v.63, n.5, p.884-897, 2016.

MÜLLEBNER, A., SASSU, E. L., LADINING, A., FRÖMBLING, J., MILLER, I., EHLING-SCHULZ, M., HENNIG-PAUKA, I., DUVIGNEAU, J. C. *Actinobacillus pleuropneumoniae* triggers IL-10 expression in tonsils to mediate colonisation and persistence of infection in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.205, n.3, p.17-23, 2018.

MCBROOM, A. J., JOHNSON, A. P., VEMULAPALLI, S., KUEHN, M. J. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. **Journal Bacteriology**, v.188, n.6, p.5385-5392, 2006.

NEGRETE-ABASCAL, E., TENORIO V. R., GUERRERO, A. L., GARCIA R. M., REYES M. E., DE LA GARZA M. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.62, n.3, p.183-190, 1998.

NEGRETE-ABASCAL, E., GARCIA, R. M., REYES, M. E., GODINEZ, D., DE LAGARZA, M. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v.19, n.7, p.109-113. 2000.

NIVEN, D. F., LÉVESQUE, 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.

NUSS, A. M., BECKSTETTE, M., PIMENOVA, M., SCHMÜHL, C., OPITZ, W., PISANO, F., HEROVEN, A. K., DERSCH, P. Tissue dual RNA-seq allows fast discovery of infection-specific functions and riboregulators shaping host-pathogen transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.114, n.5, p.791-800, 2017.

OCHSNER, U. A., JOHNSON, Z., VASIL, M. L. *Pseudomonas aeruginosa fur* overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.1099-1109, 1999.

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.

ONDRACKOVA, P., LEVA, L., KUCEROVA, Z., VICENOVA, M., MENSIKOVA, M., FALDYNA, M. Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 98, 2013.

PAPENFORT, K., VOGEL, J. Small RNA functions in carbon metabolism and virulence of enteric pathogens. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v.4, n.91, p.33-49, 2014.

PAPENFORT, K., ESPINOSA, E., CASADESÚS, J., VOGEL, J. Small RNA-based feedforward loop with DNA-gate logic regulates extrachromosomal DNA transfer in *Salmonella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.34, p.49-81, 2015.

PARK, C., HA, Y., KIM, S., CHAE, C., RYU, D. Y. Construction and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 2 mutant lacking the Apx toxin secretion protein genes apxIIIB and apxIIID. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.71, n.10, p.1317-1323, 2009.

PATTISON, I. H., HOWELL, D. G., ELLIOT, J. A. A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.67, n.4, p.320-330, 1957.

PEREIRA, M. F., ROSSI, C. C., DE QUEIROZ, M. V., MARTINS, G. F., ISAAC, C., BOSSE, J. T., LI, Y., WREN, B. W., TERRA, V. S., CUCUI, J., LANGFORD, P. R., AND

BAZZOLLI, D. M. *Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v.161, n.2, p.387-400, 2014.

PEREZ-CRUZ, C., DELGADO, L., L'ÓPEZ-IGLESIAS, C. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. **PLoS One**, p.1-18, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116896

POHL, S., BERTSCHINGER, H. U., FREDERIKSEN, W., MANNHEIM, W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the Pasteurella-Haemolytica-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* Comb. Nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, n.3, p.510-514, 1983.

PRIEBE, G. P., WALSH, R. L., CEDERROTH, T. A., KAMEI, A., COUTINHO-SLEDGE, Y. S., GOLDBERG, J. B., PIER, G. B. IL-17 is a critical component of vaccine-induced protection against lung infection by lipopolysaccharide-heterologous strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Immunology**, v.181, n.7, p.4965-4975, 2008.

RAMARAO, N., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v.11, n.70, p.1-7, 2012.

ROIER, S. et al. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. **Nature Communication**, v.7, n.10, p.1-13, 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***. 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

ROSSI, C. C., BOSSÉ, J. T., LI, Y., WITNEY, A. A., GOULD, K. A., LANGFORD, P. R., BAZZOLLI, D. M. S. A computational strategy for the search of regulatory small RNAs in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **RNA**, v.22, n.9, p.1373-1385, 2016.

SAMBROOK, et al. **Molecular cloning**. 2^a Edition. Cold Spring Harbor Lab. Press.3 Volumes. 1990.

SANCHES, N. M. **Pequenos RNAs regulatórios e virulência em *Actinobacillus pleuropneumoniae*, o agente causal da pleuropneumonia suína**. 2018. 141 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

SASSU, E. L., BOSSÉ, J. T., TOBIAS, T. J., GOTTSCHALK, M., LANGFORD, P. R., HENNIG-PAUKA, I. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. **Transboundary Emerging Diseases**, v.65. n.S1, p.72-90, 2017.

SEITZ, V., CLERMONT, A., WEDDE, M., HUMMEL, M., VILCINSKAS, A., SCHLATTERER, K., PODSIADLOWSKI, L. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. **Developmental and Comparative Immunology**, v.27, n.9, p.207-215, 2003.

SELVARAJ, V., NEPAL, N., ROGERS, S., MANNE, N. D., ARVAPALLI, R., RICE, K. M. Inhibition of MAP kinase/NF- κ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v.59, n.8, p.160-171, 2015.

SILVA, G. C. **Efeito da proteína Hfq em vesículas de membrana externa produzidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8.** 63 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

SUBASHCHANDRABOSE, S., LEVEQUE, R. M., KIRKWOOD, R. N., KIUPEL, M., MULKS, M. H. The chaperone Hfq promotes fitness of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during porcine pleuropneumonia. **Journals ASM**, v.81, n.8, p.2952-2961, 2013.

SCHALLER, A., KUHN, R., KUHNERT, P., NICOLET, J., ANDERSON, T. J., MACINNES, J. I., SEGERS, R. P., FREY, J. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Microbiology**, v.145, n.8, p.2105-2116, 1999.

SCHATZ, D., VARDI, A. Extracellular vesicles - new players in cell-cell communication in aquatic environments. **Current Opinion Microbiology**, v.43, p.148–54, 2018.

SHAKARJI L., MIKAEL L. G., SRIKUMAR R., KOBISCH M., COULTON J. W., JACQUES M. FhuA and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants. **Canadian Journal Microbiology**, v.52, n.4, p.391-396, 2006.

SHEVCHUK, N. A., BRYKSIN, A. V., NUSINOVICH, Y. A., CABELLO, F. C., SUTHERLAND, M., LADISCH, S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. **Nucleic Acid Research**, v. 32, n. 2, p. 1-12, 2004.

SMIRNOV, A., WANG, C., DREWRY, L. L., VOGEL, L. Molecular mechanisms of the mRNA repression in *trans* by a ProQ-dependent small RNA. **EMBO Journal**, v.36, n.8, p.1029-1045, 2017.

STORZ, G., VOGEL, J.; WASSARMAN, K. M. Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. **Molecular Cell**, v.43, n.6, p.880-891, 2011.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v.115, n.8, p.891-899, 2007.

SCHWECHHEIMER, C., RODRIGUEZ, D. L., KUEHN, M. J. NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. **Microbiology Open**, n.4, v.3, p.375-389, 2015.

SKLAR, J. G., GRONENBERG, L. S., MALINVERNI, J. C., KAHNE, D., SILHAVY, T. J. Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V.140, n.15, p.6400-6405, 2007.

SKOVGAARD, K., MORTENSEN, S., BOYE, M., HEDEGAARD, J., HEEGAARD, P. M. Hepatic gene expression changes in pigs experimentally infected with the lung pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* as analysed with an innate immunity focused microarray. **Innate immunity**, v. 16, n. 6, p. 343-353, 2010.

TEIXEIRA, A. C. N. **Sistemas de recuperação de ribossomos em *Actinobacillus pleuropneumoniae*: papel em virulência e resposta a diferentes condições de estresse**. 2018. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

TEGETMEYER, H. E., FRICKE K., BALTES, N. An isogenic *Actinobacillus pleuropneumoniae* AasP mutant exhibits altered biofilm formation but retains virulence. **Veterinary Microbiology**, v.137, n.3-4, p.392-396, 2009.

TOYOFUKU, M., NOMURA, N., EBERL, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. **Nature Reviews Microbiology**, v.17, n.6, p.13–24, 2019.

VAN OVERBEKE, I., CHIERS K., CHARLIER, G., VANDENBERGHE, I., VAN BEEUMEN, J., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F. Characterization of the *in vitro* adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.1, p.59-74, 2002.

WATERS, S. A., MCATEER, S. P., KUDLA, G., PANG, I., DESHPANDE, N. P., AMOS, T. G., LEOONG, K. W., WILKINS, M. R., STRUGNELI, R., GALLY, D. L., TOLLERVEEY, D., TREE, J. Small RNA interactome of pathogenic *E. coli* revealed through crosslinking of RNase E. **The EMBO journal**, v.36, n.3, p.374-387, 2016.

WAND, M. E., MCCOWEN, J. W., NUGENT, P. G., SUTTON, J. M. Use of the *Galleria mellonella* infection model to study the opportunistic pathogen *Klebsiella pneumoniae* supports the presence of a multifaceted interaction with the host immune response. **Journal Medical Microbiology**, v.62, n.12, p.1790-1798, 2013.

WAGNER, E. G., ROMBY, P. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. **Advances in Genetics**, v.90, n.S, p.133-208, 2015.

WYNS, H., CROUBELS, S., VANDEKERCKHOVE, M., DEMEYERE, K., DE BACKER, P., GODDEERIS, B. M., MEYER, E. Multiplex analysis of pro-inflammatory cytokines in serum of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected pigs. **Research in veterinary science**, v. 102, p. 45-48, 2015.

XIE, F., WANG, Y., LI, G., LIU, S., CUI, N., LIU, S., LANGFORD, P. R., WANG, C. The SapA protein is involved in resistance to antimicrobial peptide PR-39 and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 811, 2017.

- XU, Z. et al. Comparative genomic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.21, p.5625-5636, 2010.
- YUAN, F., LIAO, Y., YOU, W., LIU, Z., TAN, Y., ZHENG, C., WANG, B., ZHOU, D., TIAN, Y., BEI, W. Deletion of the *znuA* virulence factor attenuates *Actinobacillus pleuropneumoniae* and confers protection against homologous or heterologous strain challenge. **Veterinary Microbiology**, v.174, n.3-4, p.531-539, 2014.
- YUAN, F., LIAO, Y., YOU, W., LIU, C., WANG, J., ZHAO, D., TIAN, Y., BEI, W. Generation, safety and immunogenicity of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* quintuple deletion mutant SLW07($\Delta apxIC\Delta apxIIC\Delta orf1\Delta cpxAB\Delta arcA$). **Vaccine**, v.36, p.1830-1836, 2018.
- ZHANG, Z., CLARKE, T. B., WEISER, J. N. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. **The Journal of clinical investigation**, v.119, n.7, p.1899-1909, 2009.
- ZENG, Q., MC NALLY, R. R., SUNDIN, G. W. Global Small RNA Chaperone Hfq and Regulatory Small RNAs Are Important Virulence Regulators in *Erwinia amylovora*. **Journal of bacteriology**, v.195, n.8, p.1706-1717, 2013.
- 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.
- ZOU, H. Y., LIU, X. J., MA, F. Y., CHEN, P., ZHOU, R., HE, Q. G. Attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a bacterial vector for expression of *Mycoplasma hyopneumoniae* P36 gene. **The Journal of Gene Medicine**, v.13, n.4, p.221-229, 2011.
- ZDYBICKA-BARABAS, A., MAK, P., JAKUBOWICZ, T., CYTRYŃSKA, M. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.87, n.1, p.1-12, 2014.

ANEXO A - Cassete obtido por *PCR overlapping extension* (OE)

As regiões em **negrito** e sublinhado, representam o gene *rna01*. A região sublinhada antes gene *rna01*, está o promotor e a região *upstream* ao promotor. Em *itálico e sublinhado* a sequência DUS (DNA uptake system). Região **sombreada em cinza** mostra parte do gene *sbcB*. Região em **sombreada em amarelo** mostra parte do gene *eriC*. Região em **rosa** mostra o gene *cat* proveniente do cassete presente na linhagem App mutante *arfA* e as regiões -35 (**TTTAAA**) e -10 (**TACAAT**) de seu **promotor** *sodC*.

GGGTTATGATGTTGTTGCAAGAGCATTAGAAGGAGAGGAAATTACCCCGC
AAGCGGTCGGAATTGCCAACTCTTTGCAACGGTCGCCACTTATTGGACGGGTA
TTGCCGGCGGAATATTACGCCGTCTTTAACAATAGGTGCGGGAATCGGCAGC
GAAATATGGTTTTTGGAGCGGCGGTACGGTTGATCAGCGATTATTGGTTTTATTGT
GTATGGCGGCGTTTTTGGCAGGTGCAACGCAGTCGCCGATCAGTGCCAGCGTA
GTCGTTATGGAAATGACGGGAAGCCAACCGGTTCTTTTTGGGTGCTGATTGCA
AGCCTGATTGCCTCAATCGTTTCCCGCTATTTTTGTCCAAAACCTTTTTATCACTT
GGCTGCAGGTCGTTTCAGACAAAGAGTACAGGAAGAAGAAAAACGTGAGAAATC
CCTTCTAAAACAAGAAGATAAAAGGATTAATAAAAAATATTATATTTTTATTTAAAAAT
ATTTGGAACTTTTTTAAAACGGCTCAGTCTTAAATAACGCTAACTGACAGAATTT
ATGTAAGTTTTTTTCAATTCCTTAGGTAAGACCTCCCCGGCATCGCTTTCTTG
GTGCCGGGTTTTTTATGCCCGCCATTATGCATACTACGATTCACATATTTTGTA
CAGTTAAAATAGAGGAACTAAATTGAGACCTTTTAAATTCATAACTATAGTGTACA
ATACACACAGTCCATTAACCAAAAATAAAAAGGAGGAATTAGGATGAACTTTAATAA
AATTGATTTAGACAATTGGAAGAGAAAAGAGATATTTAATCATTATTTGAACCAAC
AAACGACTTTTAGTATAACACAGAAATTGATATTAGTGTTTTATACCGAAACATA
AAACAAGAAGGATATAAATTTACCTGCATTTATTTCTTAGTGACAAGGGTGAT
AAACTCAAATACAGCTTTTAGAACTGGTTACAATAGCGACGGAGAGTTAGGTTAT
TGGGATAAGTTAGAGCCACTTTATACAATTTTTGATGGTGTATCTAAACATTCTC
TGGTATTTGACTCCTGTAAAGAATGACTTCAAAGAGTTTTATGATTTATACCTTT
CTGATGTAGAGAAATATAATGGTTCGGGGAAATTGTTTCCCAAACACCTATACC
TGAAAATGCTTTTTCTTTCTATTATTCCATGGACTTCATTTACTGGGTTTAACTT
AAATATCAATAATAATAGTAATTACCTTCTACCCATTATTACAGCAGGAAAATTCA
TTAATAAAGGTAATTCAATATATTTACCGCTATCTTTACAGGTACATCATTCTGTT
TGTGATGGTTATCATGCAGGATTGTTTATGAACTCTATTCAGGAATTGTCAGATA
GGCCTAATGACTGGCTTTTATAACAAGCGGTTTGGCATAAAAAATCCCTTGTGG
TTGTTTTATGCCCGCAATTCTTTTAATTTGTAATAATTTCTGCAAATTTAACCGCT
TAGCTATGCTACAATGTGACTAATTTTTCTAATTGAAGCGATCAATGAATAAAAA
TCTTACTTTTTTCTTTTATGATTACGAAAGTTTCGGTGTGAGTCCGGCGTTAGATC
GTCCGGCACAGTTTGCCGGTATTTCGTACCGATAGTGATTTAATATCATCGGTG
AGCCGGTGATGTTTTATTGTAAGCAAACACCGGATTATTTACCTTCGCCTGAAGC
GGTGATGGTGACGGGTACTACTCCGCAACAGTGTAACGCTGAAGGCGTGCCGG

AACCGGAATTTGCCGCACGAATCCACGCTGAATTCAGCCAGCCGAACACTTGCA
TTTTAGGCTATAACAATATTCGTTATGACGATGAAATGACCCGTTATACCTTTTTTC
CGCAATTTCTTTGACCCGTATGAATATAGCTGGAAAAATGGTAATTCTCGTTGGG
ATCTGTTA**GATCTTGTTGAGCTTGTTATGCA**

- Sequências dos *primers* utilizados para a construção do cassete de DNA.

Etapa 1

Primer 1: RNA01_left_for

5' GGGTTATGATGTTGTTGCAAGAGC 3'

Primer 2: RNA01_left_rev_cat

5' GTATGCATAATGGCGGGCATAAAAAACCCGGCACC 3'

Etapa 2

Primer 5: RNA01_rt_for_cat

5' AAAAAATCCCTTGTCGGTTGTTTTATGCCCGCAATTC 3'

Primer 6: RNA01_rt_rev:

5' TGCATAACAAGCTCGAACAAGATC 3'

Etapa 3

Primer 3: cat_RNA01_for

5' GGGTTTTTTTATGCCCGCCATTATGCATACTACGATTCAC 3'

Primer 4: cat_RNA01_rev

5' GGGCATAAAACAACCACAAGGGATTTTTTTTATGCCAAACCG 3'