MARIANA WATANABE GARCIA

Vesículas de Membrana Externa (OMV) de Neisseria lactamica: Processo de Obtenção e Avaliação do Potencial Adjuvante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo - USP, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

> São Paulo 2018

MARIANA WATANABE GARCIA

Vesículas de Membrana Externa (OMV) de Neisseria lactamica: Processo de Obtenção e Avaliação do Potencial Adjuvante

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo - USP, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

Versão Original

São Paulo 2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Watanabe Garcia, Mariana Vesículas de Membrana Externa (OMV) de Neisseria lactamica: Processo de Obtenção e Avaliação do Potencial Adjuvante / Mariana Watanabe Garcia; orientador Paulo Lee Ho. -- São Paulo, 2018. 164 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Neisseria lactamica. 2. Cinética de Cultivo. 3. Vesículas de Membrana Externa. 4. Função Adjuvante. 5. Streptococcus pneumoniae. I. Lee Ho, Paulo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato (a): Mariana Watanabe Garcia

Título da Tese: Vesículas de Membrana Externa (OMV) de Neisseria lactamica: Processo de Obtenção e Avaliação do Potencial Adjuvante.

.

Orientador: Dr. Paulo Lee Ho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a, considerou o (a) candidato (a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	ı
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	
Presidente:	Assinatura:	
	Nome:	
	Instituição:	

Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan – Mestrado



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505 ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Cultivo descontínuo alimentado de Neisseria lactamica e análise da função adjuvante de suas OMV", **protocolo nº 1152/13**, sob a responsabilidade de Rocilda Perazzini Furtado Schenkman e Mariana Watanabe Garcia – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 9/10/2013.

Vigência do Projeto: 12/2013 - 01/2016	N° de animais/espécie
Centro de Biotecnologia	60 camundongos Balb/c 5 a 8 s - 18 a 22g (F);
Laboratório de Bioprocessos-2	60 camundongos C57Bl/6 - 5 a 8 s - 18 a 22g (F)

São Paulo, 9 de outubro de 2013

Marcelo L. Santoro Coordenador da CEUAIB

Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan -**Doutorado Direto**

Linhagem: BALB/c

Comissão de Ética no

ľЬ	butantan	Comissão de	Etica Uso (no de Ani	m	ais
CERTIFICADO						
Certificamos availação de e equipe; M subfilo Verte 11.794, de 8 Controle da Instituto But	s que o Projeto Intitulado "Vesículas de e seu potencial adjuvante", protocolado so laríana Watanabe García - que envolve a ebrata (exceto o homem), para fins de p 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.8 Experimentação Animai (CONCEA), e fo antan (CEUAIB) em reunião de 19/08/201:	membrana externa (OMV) de Nelss lo o CEUA nº 4938070815, sob a respo produção, manutenção elou utilização esquisa científica (ou ensino) - encont 99, de 15 de julho de 2009, com as no 1 aprovado pela Comissão de Ética no 5.	eria lactamica onsabilidade d de animais pi ra-se de acor rmas editadas o Uso de Anir	a: Processo de le Rocilda P. F. ertencentes ao fi rdo com os precisiones pelo Conselho mais do Instituto	obten Sche Io Chi eitos Nacio Butar	ição e Ankman ordata, da Lei nai de itan do
We of adjun Roci anim teaci Natio of th	certify that the proposal "Outer membrane vant potential", utilizing 108 isogenics mic lida P. F. Schenkman and team; Marian hais belonging to the phylum Chordata, su hing) - It's in accordance with Law 11.794 onal Council for Control of Animal Experin e Butantan Institute (CEUAIB) in the meet	vesicies (OMV) from Nelsseria lactami e (108 females), protocol number CEU, a Watanabe Garcia - which involves tr ibphylum Vertebrata (except human be , of October 8 2008, Decree 6899, of J hentation (CONCEA), and was approve ing of 08/19/2015.	ca: Obteinmei A 4938070818 he production, ings), for scie uly 15, 2009, ed by the Eth	nt process and e 5, under the resp , maintenance ar entific research p with the rules iss ic Committee on	valual onsib nd/or urpos sued I Anim	lon of lity of use of es (or by the al Use
Vigência da i	Proposta: de 09/2015 a 01/2018	Laboratório: Centro De E	Biotecnologia			
Procedência	a: Biotério Externo					
Espècie:	Camundongos isogénicos	Género: Fémeas	Idade:	5 a 8 semanas	N:	108

Resumo: Vesículas de Membrana Externa, OMV, são formadas a partir de evaginações da membrana externa de bactérias Gramnegativas e têm ganhado interesse principalmente em relação às suas funções biológicas e por serem uma alternativa ao desenvolvimento de novas estratégias e combinações vacinais. OMV da bactéria comensal Neisseria lactamica induzem anticorpos que possuem reatividade cruzada com N. meningitidis e podem ser, além de antigeno para a meningite B, um potencial adjuvante de mucosa. O objetivo deste trabalho é estabelecer condições de cultivo de N. lactamica para a obtenção de OMV e avaliar a função adjuvante destas OMV em combinação com a proteina heteróloga PspA5 de Streptococcus pneumoniae.

São Paulo, 20 de agosto de 2015

Peso: 18 a 20 g

Prof. Dr. Jose Ricardo Jensen Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto Butantan

Ao meu ditian, Minoru Watanabe (in memoriam), que sempre quis ter um "doutor" na família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria e satisfação que concluo este trabalho, porque sei que esses sentimentos não são apenas meus, mas também de pessoas que de alguma forma contribuíram para que a realização deste projeto fosse possível. Meus sinceros agradecimentos:

À minha família, pela união e por caminharem sempre ao meu lado. Aos meus pais, Marcelo e Sílvia, e aos meus irmãos Leonardo e Lucas, pelo amor, orações, apoio incondicional às minhas decisões, e pelo suporte financeiro que tornaram possível ser a pessoa e profissional que sou hoje. É de vocês que origina toda a minha força que me faz seguir em frente. Obrigada por tudo. Eu amo vocês.

Ao meu esposo, Marcos Carvalho, pelo amor infinito, cuidado e dedicação aos nossos projetos, por me fazer acreditar que sonhos devem ser grandes e sonhos grandes devem ser realizados. Por me fazer ver que sempre podemos ir além do que pensávamos que poderíamos. Em você me espelho para realizar o possível e o impossível. Obrigada por sempre acreditar em mim, em nós. Amo a nossa família.

À minha orientadora, madrinha e companheira leonina, Dra. Rocilda Schenkman, pela oportunidade de estar com você desde minha iniciação científica, pelos ensinamentos, confiança, paciência e amizade. Obrigada por me apresentar o mundo da pesquisa científica, e por sempre me incentivar a ser uma pessoa e profissional melhor.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Lee Ho, pelo comprometimento, disponibilidade e atenção à realização deste trabalho.

À Dra. Mickie Takagi, do Laboratório de Bioprocessos I do IBu, pela colaboração e coparticipação na realização dos cultivos em biorreatores e análises em HPLC. E a toda equipe de preparo de fermentações, Sr. Lourivaldo, Sra. Ana, Sr. Máximo e Sr. Hélio.

À Dra. Maria Leonor Oliveira e Carolina Rivillas, do Laboratório de Imunologia do IBu, pela co-orientação, paciência e dedicação em me ensinar e pela grande contribuição à realização dos ensaios imunológicos deste trabalho. À Dra. Sylvia Carneiro, do Laboratório de Biologia Celular do IBu, pela realização da microscopia eletrônica. À Dra. Aurora Cianciarullo, do Laboratório de Genética do IBu, pelas análises morfológicas das OMV. E ao Sr. Jorge Mário Ferreira Jr, do Laboratório de Imunoquímica do IBu, pela supervisão nas análises de citometria de fluxo.

Às companheiras de laboratório, Beatriz Gonçalves e Giovanna Salustiano, pela amizade, pelas conversas, ajuda e companhia principalmente nos longos dias e noites de cultivo. Obrigada pelos ensinamentos teóricos e práticos que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

Aos colegas do "laboratório de cima" e do "laboratório do lado": Camila, Douglas, Felipe, Rafaela e Paola, pela amizade e pelos momentos de descontração, pela companhia nos almoços, festinhas e risadas que sempre me recordo com muita saudade. À amiga e madrinha Stefanie Kraschowetz, pelas conversas, compreensão, incentivo e pelo apoio nos momentos de desespero. Ter você comigo nesta jornada, tornou o caminho um pouco mais leve e menos solitário.

Aos colegas da Merck, pela amizade, pelos ensinamentos técnicos e apoio nos desafios do dia-dia. Em especial ao Bruno Souza, por acreditar em mim e por abraçar juntamente comigo o desfio de concluir este trabalho enquanto me desenvolvia e me descobria nessa profissão que escolhi e hoje amo trabalhar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pelo apoio financeiro durante o período de mestrado. A todos os docentes das diferentes disciplinas cursadas ao longo da Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, pelos conhecimentos compartilhados. À Prof. Kelly Ishida, Departamento de Microbiologia do ICB, pela orientação durante a realização do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos membros da banca de transferência de nível e qualificação deste projeto de doutorado, pelas contribuições, sugestões de melhoria e ensinamentos.

Aos amigos da vida pelo carinho e suporte, e a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização desta tese.

Muito obrigada!

Para ser grande, sê inteiro: nada Teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és No mínimo que fazes. Assim em cada lago a lua toda Brilha, porque alta vive. (Ricardo Reis)

RESUMO

GARCIA, M. W. Vesículas de Membrana Externa (OMV) de Neisseria lactamica: Processo de Obtenção e Avaliação do Potencial Adjuvante. 2018. 162f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Vesículas de membrana externa, OMV, são formadas a partir de evaginações da membrana externa de bactérias Gram-negativas e têm ganhado interesse em suas funções biológicas por serem uma alternativa ao desenvolvimento de novas estratégias e combinações vacinais. OMV da bactéria comensal Neisseria lactamica induzem anticorpos que possuem reatividade cruzada com N. meningitidis e podem ser, além de antígeno para a doença meningocócica, um potencial adjuvante de mucosa. O objetivo deste trabalho é estabelecer condições de cultivo de N. lactamica para a obtenção de OMV e avaliar a função adjuvante destas OMV em combinação com o antígeno de superfície, PspA5, de Streptococcus pneumoniae. Foram realizados cultivos descontínuos em biorreatores de 5L por 10-15h. O meio de Catlin, MC, teve a concentração do substrato fonte de carbono (lactato) e aminoácidos modificada, além do acréscimo de extrato de levedura. Foram monitorados temperatura, pH, agitação e oxigênio dissolvido. Amostras foram coletadas a cada hora para análise de biomassa, consumo de nutrientes, produção de ácidos e rendimento das OMV. Foram determinados os parâmetros cinéticos de produtividade máxima de células (ProdXmáx) e de produto (ProdPmáx), fatores de conversão (Yx/s, Yp/s e Y_{p/x}) e velocidade de crescimento (μX_{max}). O meio MC3LA2AA2YE (12h), com 18,0 g/L de lactato e o dobro da concentração original dos aminoácidos do MC foi o melhor, quando comparado aos demais para a obtenção de OMV. N. lactamica, cultivada nesta condição, apresentou produtividade máxima de OMV de 30,66 mg OMV/L.h, e concentração de OMV de 340,43 mg/L, na 11ª hora de cultivo. Os ensaios imunológicos foram realizados com a formulação de OMV puras ou OMV tratadas com detergente, para a retirada de parte do lipooligossacarídeo (LOS), em combinação com a proteína PspA5 de S. pneumoniae. O esquema de imunização foi de duas doses via intranasal, em modelo murino. Foram avaliados a indução de anticorpos IgG anti-PspA5 e o potencial protetor das formulações. Os grupos vacinais com adjuvante

apresentaram indução de anticorpos IgG anti-PspA5 de aproximadamente 10⁵ng/mL e sobrevivência de 100%, 75% e 66,7%, respectivamente, para PspA5-OMV_p, PspA5-OMV_{t0,5%}, e PspA5-OMV_{t0,3%} Os resultados evidenciam atividade adjuvante determinante das OMV em combinação com a proteína heteróloga PspA5 e proteção contra o desafio de *Streptococcus pneumoniae* em modelo murino.

Palavras-chave: *Neisseria lactamica.* Cinética de Cultivo. Vesículas de Membrana Externa. OMV. Função Adjuvante. *Streptococcus pneumoniae.*

ABSTRACT

GARCIA, M. W. Outer Membrane Vesicles (OMV) from Neisseria lactamica: Cultivation Process and Evaluation of Adjuvant Potential. 2018. 162p. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Outer membrane vesicles, OMV, are formed and released from all Gram-negative bacteria's outer membrane and have gained interest due to their biological functions, as they can be a potential alternative to the development of new vaccine strategies and formulations. OMV from the commensal bacteria Neisseria lactamica induce antibodies that present cross reactivity with N. meningitidis and may be a potential mucosal adjuvant in addition to antigen for a meningococcal disease. The objective of this work is to define culture conditions of *N. lactamica* in order to obtain OMV, and evaluate the adjuvant function of their OMV in combination to the surface antigen, PspA5, from Streptococcus pneumoniae. Discontinuous batches cultures were carried out in 5L bioreactors for 10-15h. The medium of Catlin, MC, had its carbon substrate concentration (lactate) and its amino acids concentration modified according to each experiment, plus the addition of yeast extracts. Temperature, pH, agitation and dissolved oxygen were monitored. Samples were collected hourly for analysis of biomass, nutrient consumption, acid production and OMV yield. Maximal cell production products (ProdXmáx) and product (ProdPmáx), conversion factors (Yx/s, Yp/s e $Y_{p/x}$) and growth rate (μX_{max}) were obtained. The MC3LA2AA2YE medium (12h), with 18.0 g / L lactate and double the original MC amino acid concentrations, was the best formulation to obtain OMV. N. lactamica, cultivated in this condition, presented maximum OMV productivity of 30.66 mg OMV/L.h and OMV concentration of 340.43 mg/L, at the 11th hour of cultivation. Immunological assays were performed with formulations with native OMV or OMV treated with detergent to remove part of the lipooligosaccharide (LOS), in combination with S. pneumoniae PspA5 protein. Twodose of intranasal immunization were administered in mice. An induction of anti-PspA5 IgG antibodies and the protective potential of the formulations were evaluated. Adjuvanted vaccine groups showed induction of anti-PspA5 IgG antibodies of approximately 10⁵ ng/mL and 100%, 75% and 66.7% survival, respectively for PspA5OMV_p, PspA5-OMV_{t0,5%}, e PspA5-OMV_{t0,3%}. The results obtained in this project show a significant adjuvant activity of *Neisseria lactamica* OMV in combination with heterologous protein PspA5 and protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge in mice model.

Keywords: *Neisseria lactamica*. Kinetics. Outer Membrane Vesicles. OMV. Adjuvant. *Streptococcus pneumoniae.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo de origem das vesículas a partir da membrana externa de bactérias Gram-
 - peptidioglicano. IM - membrana interna. Cyt - espaço citoplasmático
Figura 2 - Fluxograma das etapas realizadas
Figura 3 – Esquema do cronograma de imunização, desafio e coleta de soro. Experimento I e Experimento II
Figura 4 – Curva de crescimento de N. lactamica (DO ₅₄₀) em agitador rotativo. 1. MC 1LA2AA2YE; 2. MC 2LA2AA2YE; 3. MC 3LA2AA2YE; 4. MC 4LA2AA2YE; 5. MC 5LA2AA2YE; 6. MC 6LA2AA2YE
Figura 5 – Rendimento de OMV de N. lactamica (mg/L) em agitador rotativo. 1. MC 1LA2AA2YE; 2. MC 2LA2AA2YE; 3. MC 3LA2AA2YE; 4. MC 4LA2AA2YE; 5. MC 5LA2AA2YE; 6. MC 6LA2AA2YE
Figura 6 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA3AA3YE (12h)
Figura 7 – Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA3AA3YE (12h)75
Figura 8 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (12h)
Figura 9 – Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (12h)
Figura 10 – Curva dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (12h) com pulso de aminoácidos na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado
Figura 11 – Dados de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (ºC) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (12h) com pulso de aminoácidos na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado

Figura 16 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (15h) com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. As setas representam o momento em que os pulsos foram dados.

Figura 17 – Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (15h) com pulso de lactato e aminoácidos na 8^a hora. As setas representam o momento em os pulsos foram dados......90

Figura 19 - Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (10h) aeração por borbulhamento e pulso de lactato e aminoácidos na 6^a hora. As setas representam o momento em os pulsos foram dados...93

Figura 29 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado

Figura 32 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 14 dias após a primeira dose da vacina O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os respectivos desvios padrão. O valor acima das barras corresponde ao valor da razão IgG1/IgG2a.... 108

Figura 34 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os respectivos desvios padrão. O valor acima das barras corresponde ao valor da razão IgG1/IgG2a.... 110

Figura 39 – Modelo esquemático do metabolismo de Neisseria lactamica......116

Figura 42 – Concentração de lactato (mg/L) e oxigênio dissolvido (%). Grupo A. MC 3LA3AA3YE. Grupo B. MC 3LA2AA2YE. Grupo C. MC 3LA2AA2YE com pulso de aminoácidos na 8ª hora. Grupo D. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. Grupo E.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3 – Esquema de Grupos e formulações. Experimento I.64

Tabela 5 – Resumo dos meios de cultura e tempo de cultivo dos ensaios em agitador rotativoe biorreator.70

Tabela 6 – Crescimento de N. lactamica (DO₅₄₀) em agitador rotativo. MC (meio de Catlin); LA (lactato); AA (aminoácidos); YE (extrato de levedura)......71

Tabela 15 – OMV (mg/mL) pós-tratamento, recuperação (%), concentração de KDO (µg/mg de OMV), e porcentagem de KDO eliminado em cada tratamento.......97

Tabela 16 - Treze compostos intermediários precursores......115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA Aminoácidos
- AMH Ágar Müller- Hinton
- ATP Adenosina trifosfato
- BSA Albumina de Soro Bovino
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- DO Densidade óptica
- DO540nm Densidade óptica com comprimento de onda de 540 nm
- dOMV Vesícula de Membrana Externa detoxificada
- ELISA "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"
- fHbp Proteína que se liga à heparina
- FITC Isotiocianato de fluoresceína
- i.n. Intranasal
- i.p. Intraperitoneal
- IgG Imunoglobulina G
- IgG1 Imunoglobulina G subclasse 1
- IgG2a Imunoglobulina G subclasse 2a
- IRP proteínas reguladas pelo ferro
- KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- LA Lactato
- LOS Lipoligossacarídeo
- LPS Lipopolissacarídeo.
- MC Meio de Catlin
- OMV Vesículas de membrana externa
- OMV_p Vesículas de membrana externa puras ou nativas
- OMVt0,3% Vesículas de membrana externa tratadas com DOC em concentração 0,3%
- OMV_{t0,5%} Vesículas de membrana externa tratadas com DOC em concentração 0,5%
- Opa/Opc Proteínas de opacidade
- OPD Ortofenilenodiamina
- PAMP Padrão molecular patógeno-associado
- PBS Solução salina tamponada com fosfato
- PBS-T Solução salina tamponada com fosfato e com tween
- PCR Reação em cadeia da polimerase

- pH Potencial hidrogeniônico
- PorA Proteína porina A
- PorB Proteína porina B PP Via das pentoses
- PspA Proteína A de superfície de pneumococo
- rpm Rotação por minuto
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida
- TBS Tampão fosfato-salino
- TCA Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
- THY Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura
- VLP Virus like-particules
- YE Extrato de levedura ultrafiltrado

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- °C Graus Celsius
- bar Unidade de pressão correspondente a aproximadamente 1 atm
- ε Constante dielétrica média
- g Grama
- h Hora
- kDa Quilodalton
- kV Quilovolts
- L Litro
- M Molar
- mA Miliampére
- mg Miligrama
- min Minuto
- mL Mililitro
- mM Milimolar
- nL Nanolitros
- nm Nanômetros
- Pi- Concentração de produto inicial (mg/L)

Pmáx- concentração máxima de produto (mg/L)

Si - Concentração de substrato inicial (g/L)

Spmáx- Concentração de substrato quando a concentração do produto é máxima

Sxmáx- Concentração de substrato quando a concentração celular é máxima (g/L)

- tfp Tempo de cultivo correspondente a Pmáx (h)
- tfx Tempo de cultivo correspondente a Xmáx (h)
- ti Tempo inicial
- UV Ultravioleta
- V Volts
- v Volume
- X Concentração celular (g/L);
- Xi Concentração celular inicial (g/L)
- Xmáx Concentração máxima celular (g/L)
- YP/S Fator de conversão substrato/produto (g produto/g substrato)

- YP/X Fator de conversão célula/produto (g produto/g biomassa)
- YX/S Fator de conversão substrato/célula (g biomassa/g substrato)
- µg Micrograma
- µL Microlitro
- µx Velocidade específica de formação de biomassa (h-1);
- µxmáx Velocidade específica de geração de biomassa (h-1)

SUMÁRIO

1.	INTRO	INTRODUÇÃO		
	1.1.	OMV: Estrutura e Composição	28	
	1.2.	OMV: Biogênese	30	
	1.3.	OMV: Funções Biológicas	31	
	1.4.	OMV: Aplicação – Antígeno	35	
	1.5.	OMV: Aplicação – Adjuvante	39	
	1.6.	OMV: Processo de Obtenção	41	
	1.7. Biotec	<i>N. lactamica</i> : Estudos do Cultivo, Produção de OMV e Aplicação nológica	44	
2.	OBJE	TIVO	47	
	2.1.	Geral	47	
	2.2.	Específico	47	
	3.1.	Cultivo de Neisseria lactamica	50	
	3.1	.1. Microrganismo	50	
	3.1	.2. Meios de Cultura	50	
	3.1	.3. Lote Semente e Lote Trabalho	51	
	3.1	.4. Ativação Inicial das Cepas	52	
	3.1	.5. Preparo do Inóculo	52	
	3.1	.6. Cultivos em Biorreator: Parâmetros Físico-Químicos	52	
	3.1	.7. Concentração Celular e Massa Seca	53	
	3.2.	Delineamento dos Experimentos	54	
	3.2	.1. Cultivo em Agitador Rotativo	54	
	3.2	.2. Cultivos em Biorreator	54	
	3.3.	Vesículas de Membrana Externa (OMV)	56	
	3.3	.1. Purificação e Dosagem	56	
	3.3	.2. Eletroforese	56	

	3.3.3.		Tratamento com Detergente	56
	3.3	.4.	Análise Morfológica	57
	3.4.	Ar	nálise de Ácidos Orgânicos	59
	3.5.	Pa	arâmetros Cinéticos	60
	3.6.	Er	nsaios Imunológicos	63
	3.6	.1.	Soluções e Meios de Cultivo	63
	3.6	.2.	Experimento I e II: Cronograma de Imunização, Grupos e Formulações	63
	3.6	.3.	Soro	66
	3.6	.4.	Resposta imune contra o antígeno PspA5	67
	3.6	.5.	Resposta imune contra o antígeno OMV	68
	3.6	.6.	Ligação de anticorpos à superfície de S. pneumoniae	68
	3.6	.7.	Desafio respiratório letal com S. pneumoniae	69
	3.6	.8.	Análises Estatísticas	69
4.	RESU	JLT	ADOS	70
	4.1.	Er	nsaio em Agitador Rotativo	71
	4.2.	Er	nsaios em Biorreator	73
	4.2	.1.	Grupo A: MC 3LA3AA3YE (12h)	73
	4.2	.2.	Grupo B: MC 3LA2AA2YE (12h)	76
	4.2	.3.	Grupo C: MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso AA 8ªh	79
	4.2	.4.	Grupo D: MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso LA 8 ^a h	82
	4.2	.5.	Grupo E: MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA 8 ^a h	85
	4.2	.6.	Grupo F: MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA e AA 8ªh	88
	4.2	.7.	Grupo G: MC 3LA2AA2YE (10h) + borbulhamento de ar + pulso LA e AA	6h
			91	
	4.3.	Pa	arâmetros Cinéticos	94
	4.4.	0	MV: Eletroforese	96
	4.5.	0	MV: Tratamento com detergente	97
	4.6.	0	MV: Análise Morfológica1	00

e <i>ria lactamica</i> tratadas
eria lactamica não
107
tígeno OMV 112
115
V) com detergente 133
Resposta imune contra
ae 137
140
143
158
111 tígeno OMV

1. INTRODUÇÃO

1.1. OMV: Estrutura e Composição

Vesículas de membrana externa, ou OMV (*Outer Membrane Vesicles*), são estruturas em geral esféricas, podendo ter formato irregular e de tamanho variável de 20-250 nm de diâmetro. São formadas a partir da evaginação da membrana externa de todas as bactérias Gram-negativas durante o crescimento do microrganismo (Devoe e Gilchrist, 1973; Schwechheimer *et al.*, 2013).

O envelope celular de bactérias Gram-negativas consiste de duas membranas: a membrana externa e a membrana citoplasmática, intermediadas pelo espaço periplasmático (Pp), que contém uma camada de peptidioglicano (PG). A membrana externa é uma barreira periférica das células composta por uma camada interna de fosfolipídios e uma camada de lipopolissacarídeo (LPS, também conhecido como endotoxina). A membrana citoplasmática consiste em uma bicamada de fosfolipídio que serve como barreira eletroquímica. O periplasma é um ambiente oxidativo que possui proteínas, mas não contém nucleotídeos fonte de energia, como ATP ou GTP. A camada de PG líquida, dentro do periplasma, dá forma à bactéria e a protege de pressões osmóticas e mecânicas (Kuehn e Kesty, 2005; Schwechheimer *et al.*, 2013) (**Figura 1**).

As proteínas do envelope–são proteínas periplasmáticas solúveis, proteínas associadas à membrana e lipoproteínas, em sua maioria. O lúmen da vesícula pode conter compostos do periplasma ou citoplasma, tais como proteínas, peptidioglicano (PG), e, em alguns casos, RNA e DNA (Kuehn e Kesty, 2005; Mashburn-Warren *et al.*, 2008; Schwechheimer *et al.*, 2013; Van Der Pol *et al.*, 2015).

Estudos de proteômica, utilizando espectrometria de massa, verificaram que o número total de proteínas em uma OMV varia de 50-338, dependendo da técnica e da espécie de bactéria. 40-80% das proteínas foram identificadas como proteínas de membrana externa, destacando-se as porinas, proteínas de transporte, adesinas, enzimas como fosfolipases e proteases e proteínas do flagelo ou pilus, quando estes

estão presentes nos microrganismos (Van Der Ley *et al.*, 1991; Lappann *et al.*, 2013; Kulkarni e Jagannadham, 2014; Van Der Pol *et al.*, 2015). Além destas proteínas, outras toxinas e enzimas como proteases e ureases, proteínas desconhecidas provenientes de outros compartimentos celulares, e proteínas contaminantes, também foram identificadas (Kulp e Kuehn, 2010; Van Der Pol *et al.*, 2015).

Em um estudo analisando proteínas nas OMV de *Neisseria meningitidis*, Lappan (2013) identificou 155 proteínas, incluindo antígenos de membrana utilizados para o desenvolvimento da vacina MenB, tais como a porina A (PorA), a proteína de ligação do fator H (fHbp), a *Neisserial* Adesina A (NadA) e a proteína associada à opacidade C (Opc). Já Salustiano (2015), por espectrometria de massa, identificou 243 proteínas na OMV de *N. meningitidis*, sendo 54 proteínas de membrana, e 229 proteínas em OMV de *N. lactamica*, sendo 77 proteínas de membrana.

As vesículas de membrana externa (OMV) também podem ser encontradas com as nomenclaturas: proteolipossomos, proteossomos ou nanopartículas (Acevedo *et al.*, 2014)

Figura 1 – Modelo de origem das vesículas a partir da membrana externa de bactérias Gram-negativas. LPS - lipopolissacarídeo. Pp - espaço periplasmático. OM - membrana externa. PG - peptidioglicano. IM - membrana interna. Cyt - espaço citoplasmático.



Fonte: Adaptado de Kuehn e Kesty (2005)

1.2. OMV: Biogênese

A vesiculação é uma característica de todas as bactérias Gram-negativas e a presença de vesículas de membrana externa em cultivos bacterianos é notada há mais de 50 anos (Kulkarni e Jagannadham, 2014). No entanto, durante muito tempo sustentou-se a ideia de que a presença de material vesicular estava diretamente relacionada à presença de detritos celulares, e não havia distinção entre vesículas que eram resultado de lise bacteriana e OMV intactas (Schwechheimer et al., 2013; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Estudos posteriores dessas vesículas revelaram que o conteúdo das OMV (tais como lipídios e proteínas), poderia ser maior ou menor dependendo da prevalência do mesmo no envelope bacteriano, e que o processo de formação das vesículas ocorre não necessariamente somente durante a lise celular. Além disso, observou-se que o processo de formação das vesículas requer um alto gasto de energia implícito na perda de lipídios e proteínas (Kulp e Kuehn, 2010). Cultivos de diferentes bactérias Gram-negativas mostraram que a taxa de vesiculação pode ser alterada por fatores tais como temperatura, disponibilidade de nutrientes no meio, processos de oxidação e pela presença de antibióticos que tenham como alvo o envelope celular, entre outros (Mcbroom e Kuehn, 2007; Macdonald e Kuehn, 2013; Schwechheimer e Kuehn, 2015). Essas observações contribuíram para apoiar o conceito de que a vesiculação é um processo possivelmente conservado em diferentes espécies bacterianas, e talvez seja essencial ao microrganismo, uma vez que possui origem de formação regulada (Horstman e Kuehn, 2000; Kulp e Kuehn, 2010; Schwechheimer et al., 2013).

O processo exato da biogênese das OMV não é conhecido atualmente. No entanto, alguns mecanismos foram propostos e, pode ser possível, que todos eles trabalhem juntos para a formação de OMV (Kulkarni e Jagannadham, 2014).

Nos anos 70, quando estudos da origem de formação das OMV se iniciaram, as primeiras observações foram de que as OMV evaginavam a partir da membrana externa, apesar da presença de ligações covalentes entre a camada de peptidioglicano e a membrana externa (Burdett e Murray, 1974; Hoekstra *et al.*, 1976). Nos anos 80, em estudos com *E. coli*, verificou-se que as OMV continham quantidade

de lipoproteínas relativamente menor quando comparadas à membrana externa, sugerindo que determinadas proteínas poderiam desempenhar um papel importante na formação das vesículas e que as OMV poderiam ser formadas em resposta a um crescimento acelerado da membrana externa em relação à parede celular e às lipoproteínas associadas (Wensink e Witholt, 1981). Zhou *et al.* (1998), propôs que a produção das OMV era resultado de uma regeneração da parede celular. De acordo com suas observações, durante a síntese da parede celular, peptidoglicanos e ácido murâmico exercem uma pressão de turgor contra a membrana externa. A produção das vesículas seria então uma estratégia da célula em aliviar a pressão causada pelo excesso de materiais na parede. A crítica atual a esse modelo se dá pelo fato de não explicar a presença de componentes do citoplasma e eventualmente de ácidos nucléicos no lúmen das OMV, tal como foi comprovado em estudos posteriores (Haurat *et al.*, 2011; Kulkarni e Jagannadham, 2014).

Uma das hipóteses mais aceitas sobre a origem das OMV é a sua produção em resposta a um estresse sofrido pela célula. Pesquisas sobre o surgimento e a evolução das OMV defendem que o processo de vesiculação possa ter se iniciado em resposta a um estresse interno ou externo ao microrganismo e, ao longo da evolução das OMV, este processo tenha sido adaptado a outras funções biológicas e se conservado nas populações subsequentes (Kulp e Kuehn, 2010; Kulkarni e Jagannadham, 2014; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Pathirana e Kaparakis-Liaskos, 2016).

1.3. OMV: Funções Biológicas

Estudos sobre a função biológica das OMV para os microrganismos têm ganhado relevância principalmente pela importância na sobrevivência de bactérias tanto patogênicas quanto não patogênicas ou comensais, e pelo interesse em possíveis aplicações biotecnológicas (Kulkarni e Jagannadham, 2014; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Pathirana e Kaparakis-Liaskos, 2016; Roier *et al.*, 2016).

Pesquisas têm demonstrado que as OMV, dentre outras funções, podem auxiliar na defesa e resistência bacteriana, possibilitar o transporte e secreção de moléculas ativas para sítios distantes e facilitar a aquisição de nutrientes (Kuehn e Kesty, 2005; Kulp e Kuehn, 2010).

Estudos com OMV de *Pseudomonas putida* mostraram que estresse proveniente de fontes químicas bem como físicas, tais como a presença de concentrações tóxicas de determinadas substâncias, como variação da pressão osmótica e de temperatura, causam uma maior liberação de OMV para o meio (Baumgarten *et al.*, 2012). Interessantemente, McBroom e Kuehn (2007) observaram que mutantes que apresentavam maiores taxas de vesiculação, eram mais resistentes a estresse por variações térmicas.

Outra observação interessante realizada por Manning e Kuehn (2011) foi o aumento da taxa de liberação de OMV em resposta à ação de antibióticos que atuam diretamente na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Nesse caso, as OMV conferiram proteção às bactérias através de um mecanismo de adsorção do antibiótico, diminuindo a concentração da droga que atacaria as bactérias. Também foi verificado que OMV fortemente associadas a comunidades bacterianas (biofilmes) também contribuem significativamente para a resistência aos antibióticos (Loeb e Kilner, 1978).

Foi constatado que durante um ataque de fagos, as bactérias liberam maior quantidade de OMV para o meio. Esse mecanismo ajudaria as bactérias a evitar a infecção, liberando imediatamente o fago antes que o DNA deste fosse injetado. Dessa forma, com uma maior quantidade de OMV dispersas no meio, estas "mimetizariam" as bactérias durante o ataque, protegendo-as (Loeb e Kilner, 1978; Kulp e Kuehn, 2010).

Além de seu papel na defesa e resistência bacteriana, as OMV também são consideradas um sistema de secreção e transporte do qual podem disseminar produtos bacterianos ativos que irão interagir com o meio. As OMV possuem três características principais e únicas, que tornam a secreção via OMV efetiva, apesar do

alto gasto energético envolvido neste processo. A primeira característica é possibilitar a secreção de lipídios bacterianos, proteínas de membrana, e outros compostos insolúveis. Essa característica pode ser extremamente favorável a bactérias patogênicas, por exemplo, durante a formação de biofilmes, quando a presença de proteínas de membrana externa, biologicamente ativas, como as adesinas, são indispensáveis neste processo (Grenier e Mayrand, 1987; Beveridge, 1999; Kulp e Kuehn, 2010). A segunda característica é possibilitar a secreção de proteínas solúveis, que podem ser transportadas a nichos distantes dentro de um ambiente protegido do ataque de proteases, no lúmen das OMV (Grenier e Mayrand, 1987; Kulp e Kuehn, 2010). E a terceira característica é possibilitar o transporte e secreção de proteínas em altas concentrações até atingirem proximidade ao sítio-alvo de atuação (Kulp e Kuehn, 2010).

O conteúdo solúvel das OMV quando atinge o sítio-alvo pode ser liberado nas células alvo e desencadear processos bioquímicos através três mecanismos: (1) lise proximal, difusão e internalização; (2) fusão; (3) endocitose (Kulp e Kuehn, 2010).

No primeiro mecanismo, as OMV sofreriam uma lise espontânea, permitindo que o seu conteúdo se difundisse e, por conseguinte, se internalizasse na célula-alvo. Embora lise espontânea seja rara, estudos demonstraram que esse processo pode ser desencadeado quando próximo a um sítio-alvo. Além disso, autores defendem que a liberação de auto-lisinas pelas OMV pode estar relacionada a um mecanismo de competição bacteriana pela colonização de determinados nichos (Kadurugamuwa e Beveridge, 1996; Li *et al.*, 1998).

Em relação ao mecanismo de fusão, Kadurugamuwa e Beveridge (1999) observaram em um experimento que rastreava as OMV, que o conteúdo das vesículas foi diretamente depositado em células alvo e estava presente na membrana externa de bactérias e células hospedeiras. No entanto, embora as observações deste experimento evidenciem a fusão de OMV e deposição de seu conteúdo em células alvo, ainda não está claro por que as OMV são capazes de se fusionarem com células alvo, enquanto células bacterianas não se fusionam entre si e nem com outras células eucarióticas. Algumas hipóteses apontam que haja fatores de inibição de fusão na

superfície das células que estão ausentes na superfície das OMV, ou, que a curvatura das OMV possa facilitar a fusão das membranas (Kuehn e Kesty, 2005; Kulp e Kuehn, 2010).

O terceiro mecanismo é a endocitose em células eucarióticas, que resulta na entrada total das OMV no interior das células (Kulp e Kuehn, 2010). As consequências desse mecanismo são particularmente observadas em microrganismos patogênicos, por exemplo, a endocitose de OMV por células apresentadoras de antígenos resultaria na apresentação de epítopos bacterianos ao sistema imune, desencadeando respostas pró-inflamatórias (Kuehn e Kesty, 2005; Alaniz *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de sobrevivência observado em experimentos com OMV é a capacidade de lisar células intra e interespécies que sofram de má nutrição ou que estejam com o crescimento comprometido (Kadurugamuwa e Beveridge, 1996; Li *et al.*, 1998). Foi verificado que OMV podem atacar tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, contudo, o mecanismo de ataque é diferente. Nas Gram-positivas, as OMV aderem à parede celular da bactéria e depositam o conteúdo de seu lúmen – rico em PGase, hidrolisando a camada de peptidioglicano e causando uma lesão pontual na parede celular. Nas Gram-negativas, as OMV aderem à membrana externa das bactérias e fusionam-se a elas. Dessa forma, o conteúdo luminal é liberado dentro do espaço periplasmático, causando lesões em diferentes locais (Li *et al.*, 1998; Beveridge, 1999). Vários autores sustentam o conceito que tal mecanismo ocorre para a aquisição de nutrientes, uma vez que as OMV são ricas em íons, lipídios, polipeptídios e outros componentes que podem ser essenciais ao crescimento e que estejam ausentes no meio (Li *et al.*, 1998; Beveridge, 1999; Kulp e Kuehn, 2010).

Portanto, as OMV podem ser consideradas um mecanismo bacteriano de resposta a estresses. Contudo, sendo a biogênese um fenômeno que ocorre mesmo na ausência de estresse, outros fatores biológicos relacionados à sobrevivência e adaptação dos microrganismos ao meio – como secreção, transporte, aquisição de nutrientes – também desempenham papel importante para o estabelecimento e
manutenção deste mecanismo de defesa e resistência bacteriana (Kulkarni e Jagannadham, 2014).

1.4. OMV: Aplicação – Antígeno

As OMV, por todas as suas características de formação, estrutura e composição, além de suas funções biológicas já descritas, naturalmente contêm componentes imunomoduladores (por exemplo, LPS, proteínas) e moléculas antigênicas que podem ser apresentadas a células competentes do sistema imune, desencadear a ativação de sinais e estimular a resposta imune humoral e mediada por células (Bachmann e Jennings, 2010; Ellis e Kuehn, 2010; Acevedo *et al.*, 2014).

Vacinas de OMV vêm sendo desenvolvidas há mais de 20 anos e a indução de anticorpos e respostas de proteção já foram observadas contra diferentes antígenos de *Bordetella pertussis*, patógenos entéricos tais como *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Escherichia coli*; contra a micobactéria causadora da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando OMV da bactéria não patogênica *Mycobacterium smegmatis*, entre outros. O caso clássico de maior destaque é o uso de vacinas de OMV de *Neisseria meningitidis* contra a doença meningocócica (Acevedo *et al.*, 2014).

Desde 1960, vacinas polissacarídicas foram desenvolvidas contra meningite sorogrupos A e C; e desde 1980, contra os sorogrupos A, C, Y e W em crianças menores de dois anos de idade (Miller *et al.*, 2011; Holst *et al.*, 2013). No entanto, essas vacinas polissacarídicas falhavam na indução de anticorpos bactericidas contra o sorogrupo B, devido à similaridade estrutural do monômero de ácido siálico presente no polissacarídeo capsular do sorogrupo B e em células neuronais humanas (Finne *et al.*, 1983; Zollinger e Moran, 1991). Desse modo, uma vacina composta pelo polissacarídeo de *N. meningitidis* B foi questionada em relação a possíveis efeitos de tolerância imunológica ou reações autoimunes (Finne *et al.*, 1983).

Uma estratégia alternativa para a vacina contra o sorogrupo B foi o desenvolvimento de vacinas proteicas, com foco nas OMV. O uso das vacinas de OMV tem sido a única formulação eficaz contra o sorogrupo B (Holst et al., 2009), mostrando-se efetivo no controle de surtos epidemiológicos em Cuba, Noruega, Chile, Brasil e Nova Zelândia em jovens e adultos na região onde a cepa circulante predominante foi a mesma utilizada na composição da vacina (Fredriksen *et al.*, 1991; Sierra *et al.*, 1993; Thornton *et al.*, 2006; Holst *et al.*, 2013).

Os antígenos imunodominantes da OMV de *N. meningitidis* são as porinas, principalmente PorA e PorB (Feavers e Pizza, 2009). Devido ao fato que existe uma alta variabilidade entre essas proteínas em cepas do mesmo sorogrupo, alguns pesquisadores começaram a adotar no final dos anos 90, a "vacinologia reversa" como estratégia para desenvolver vacinas multivalentes, na tentativa de aumentar o espectro de cobertura das mesmas (Claassen *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 1996; Rappuoli, 2001; Giuliani *et al.*, 2006; Santolaya *et al.*, 2012).

O termo "vacinologia reversa", denominado por Rappuoli (2001), refere-se à técnica de identificar as proteínas que estão expostas à superfície do patógeno, utilizando informações do próprio genoma sequenciado do microrganismo, sem a necessidade de cultivá-lo (Seib et al., 2012). O primeiro patógeno utilizado para o estudo dessa abordagem foi o meningococo B. Cerca de 600 proteínas (proteínas de membrana externa, proteínas de superfície e lipoproteínas associadas à superfície) foram identificadas como potenciais antígenos ou candidatos vacinais e tiveram suas sequências expressas em E. coli (Giuliani et al., 2006). Análises de sequências proteicas foram realizadas para verificar a antigenicidade das mesmas e poucas puderam ser consideradas como boas candidatas à vacina, uma vez que não induziram a produção de anticorpos com atividade bactericida associada a imunidade protetora contra cepas de meningite B (Ginsberg, 2004). Dessa forma, a adição de OMV detoxificadas (dOMV, do inglês, detergent ou detoxified OMV) aos antígenos selecionados através do genoma do patógeno se fez necessária para se obter uma resposta imune abrangente a diversas cepas de N. meningitidis (Santolaya et al., 2012). As dOMV adicionadas à formulação da vacina foram as mesmas utilizadas como componente ativo principal na vacina para o controle de surto epidemiológico

na Nova Zelândia (Van Der Pol *et al.*, 2015). Esta primeira vacina desenvolvida com base em "vacinologia reversa" é comercialmente conhecida como Bexsero (Novartis) e está atualmente aprovada para uso humano pelo EMA, FDA e pelo governo da Austrália (O'ryan *et al.*, 2014; Klimentová e Stulík, 2015; Van Der Pol *et al.*, 2015).

A **Tabela 1** a seguir, adaptada de Van Der Pol *et al.* (2015), Acevedo *et al.* (2014), de Kleijn (2000), e Gorringe (2009) mostra as vacinas desenvolvidas com OMV de *N. meningitidis* tipo B ou *N. lactamica* atualmente licenciadas e/ou testadas em ensaios clínicos.

Tabela 1 - Vacinas desenvolvidas com OMV de *N. meningitidis* tipo B ou *N. lactamica* atualmente licenciadas e/ou testadas em ensaios clínicos (adaptada de Van Der Pol *et al.* (2015), Acevedo *et al.* (2014), de Kleijn (2000), e Gorringe (2009).

Vacina	Desenvolvimento	Informação adicional
VA-MENGOC-BC®	Desenvolvimento: 1987 a 1989 (Cuba) Componentes: Múltiplos (dOMV) – OMP (PorA), polissacarídeo do meningococo C, LPS; AIOH (adjuvante). Eficácia: 83%	Vacina licenciada. Parte do Programa Nacional de Imunização de Cuba por mais de 20 anos
MenBvac®	Desenvolvimento: 1988 a 1991 (Noruega) Componentes: Múltiplos (dOMV); AIOH (adjuvante) Eficácia: 57%	Vacina licenciada. A tecnologia utilizada permitiu o desenvolvimento das vacinas MeNZB® e Bexsero®
MeNZB®	Desenvolvimento: 2004 a 2008 (Nova Zelândia) Componentes: Múltiplos (dOMV); AIOH (adjuvante) Eficácia: 73-85%	Vacina licenciada. Parcerias com WHO, governo da Nova Zelândia, Universidade de Auckland, NIPH e Chiron permitiu a realização de vários ensaios clínicos
Bexsero®	Desenvolvimento: 2010 - Novartis (Suíça) Componentes: dOMV da Nova Zelândia, NHBA, fHbp, NadA; AlOH (adjuvante) Eficácia: Indução de anticorpos bactericidas (SBA) – 66 a 91%	Vacina licenciada. Desenvolvida por vacinologia reversa. Combinação de dOMV da Nova Zelândia com três antígenos recombinantes, dois dos quais são proteínas fusionadas (NHBA e fHbp)
Hexamen	Desenvolvimento: início 2000 (Holanda) Componentes: 6 subtipos de PorA; AIPO ₄ (adjuvante) Eficácia: Indução de SBA	Ensaio clínico fase I e fase II. Foram desenvolvidas duas vacinas de OMV trivalentes. A combinação das OMV na formulação das vacinas expressa genes de PorA prevalentes em 6 soro subtipos diferentes

<i>N. lactamica</i> , DOMV	Desenvolvimento: Início 2009 (UK) Componentes: Múltiplos; AIOH (adjuvante) Eficácia: Aumentos no título de SBA contra cepas de <i>N. meningitidis</i> B e aumento na atividade OPA contra uma maior variedade de cepas	Autores sugerem que esta vacina pode fornecer uma base segura e imunogênica para uma vacina combinada contendo outros antígenos, atuando como adjuvante para os componentes adicionais e proporcionando proteção contra algumas cepas.
----------------------------	--	---

A imunidade natural contra *N. meningitidis* é adquirida na infância e juventude através de colonizações sucessivas por espécies comensais do gênero *Neisseria;* sendo *N. lactamica* talvez a mais importante dentre elas, por ser uma das primeiras espécies de bactéria a colonizar a nasofaringe de neonatos e por compartilhar antígenos que apresentam reatividade cruzada com o meningococo (Troncoso *et al.*, 2000; Pollard e Frasch, 2001; Sánchez *et al.*, 2001; Troncoso *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de vacinas de OMV de *N. lactamica* tem sido uma abordagem promissora contra a doença meningocócica do sorogrupo B (Pollard e Frasch, 2001; Fukasawa *et al.*, 2003; Gorringe *et al.*, 2005; Finney *et al.*, 2008; Gorringe e Van Alphen, 2009; Holst *et al.*, 2013; Acevedo *et al.*, 2014), uma vez que a imunidade induzida por *N. lactamica* não é sorogrupo específica, pois esta espécie não possui cápsula polissacarídica, componente determinante do sorogrupo da doença meningocócica (Gold *et al.*, 1978).

Em diferentes estudos já foi demonstrado que a imunização de camundongos com OMV de *N. lactamica* induz anticorpos que apresentam reatividade cruzada contra *N. meningitidis* (Troncoso *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2001; Finney *et al.*, 2008). Salustiano (2015), realizou ensaios de imunoblote e ELISA, e demonstrou que os soros gerados contra as proteínas isoladas PorB, Opa/Opc, e ComL de *N. lactamica* foram reativos com proteínas ortólogas de *N. meningitidis*, assim como o soro anti-OMV de *N. lactamica* reagiu com 6 proteínas de *N. meningitidis*: as proteínas App, Omp85, PilQ, TbpB, PorA e PorB. Além disso, Olivier *et al.* (2002) mostrou em seu estudo que a imunização com OMV de *N. lactamica* gerou proteção contra desafio letal de várias cepas do meningococo em modelo animal para a doença meningocócica.

Recentemente. Estudos de casos controle da efetividade da vacina OMV de *N. meningitidis* B usada na Nova Zelândia mostrou, pela primeira vez, proteção evidente contra *N. gonorrhoea.* Nesse sentido, é interessante a perspectiva de que OMV de *Neisseria* podem induzir imunidade cruzada contra infecção por diferentes espécies deste gênero (Petousis-Harris *et al.*, 2017).

As análises realizadas com OMV de *N. lactamica* e *N. meningitidis* demonstraram que, nas condições estudadas, o diâmetro e a carga diferem entre si, sendo que a OMV de *N.* meningitidis tem carga negativa e diâmetro, em média, de 141,4nm e a OMV de N. *lactamica* tem carga neutra e diâmetro, em média, de 110,7nm, sendo estas características vantajosas para o desenvolvimento de vacinas por diminuir a interação inespecífica com diferentes células (Salustiano, 2015).

1.5. OMV: Aplicação – Adjuvante

Além da possibilidade de utilização das OMV como antígeno, também tem sido corroborada sua função como adjuvante em vacinas. Adjuvante é uma substância adicionada a um antígeno com a finalidade de aumentar a resposta imune dos indivíduos vacinados (FDA, 2014). Atualmente, a pesquisa em adjuvantes é um elemento crucial no desenvolvimento de vacinas e a maioria dos adjuvantes clássicos tem histórico de causar reações de hipersensibilidade local ou sistêmicas, e poucos têm sido licenciados para uso em vacinas em humanos (Fateh *et al.*, 2016).

OMV de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B é um dos componentes de origem microbiana mais estudada no que diz respeito à aplicação como adjuvante (Sharifat Salmani *et al.*, 2009; Moshiri *et al.*, 2012). A propriedade adjuvante de OMV proveniente deste e de outros microrganismos vem sendo demonstrada em diversos estudos de desenvolvimento de vacinas. Dentre os principais destacam-se vacinas para a doença causada pelo vírus da influenza (Haneberg, 1998 – artigo do Salmani, 2009), vírus sincicial respiratório (Etchart *et al.*, 2006), hepatite B (Sardiñas *et al.*, 2006), brucelose (Sharifat Salmani *et al.*, 2009), vírus da herpes genital (Del Campo

40

et al., 2010), para a doença meningocócica tipo B (Tamargo *et al.*, 2013), HIV (Aghasadeghi *et al.*, 2011) e, mais recentemente, têm-se discutido sua aplicação como adjuvante para diferentes tipos de vacinas de câncer (Gujrati e Jon, 2014).

Tamargo *et al.* (2013) avaliou a formulação da vacina cubana VA-MENGOC-BC® sem a presença do adjuvante hidróxido de alumínio. O autor observou que as OMV de *N. meningitidis* B, além de seu uso como antígeno, também apresentava propriedade adjuvante. Esta nova formulação estimulou a resposta sistêmica de anticorpos bactericidas (SBA) contra o meningococo B, estimulou memória imunológica, similarmente à vacina atualmente licenciada, com menores dosagens de OMV. Além disso, a formulação com OMV, sem hidróxido de alumínio apresentou menos reações inflamatórias no local da injeção. Sendo assim, as OMV por si só apresentam as duas atividades, de antígeno e de adjuvante.

Outro exemplo de sucesso é o desenvolvimento de uma vacina humana contra brucelose. Atualmente não há vacinas contra brucelose licenciadas para uso humano e as vacinas para aplicação no controle de zoonoses mostram-se não efetivas na proteção a longo prazo (Sharifat Salmani *et al.*, 2009). Um estudo liderado por Sharifat Salmani *et al.* (2009), avaliou o uso de OMV de *N. meningitidis* B como potencial adjuvante para o desenvolvimento da vacina humana de subunidade de LPS de *Brucella abortus*. Os resultados foram comparados com adjuvantes completos e incompletos de Freund (CFA e IFA). A vacina com OMV foi a que apresentou resposta mais imunogênica quando comparada às outras combinações de adjuvantes, além de ser considerada segura para imunização subcutânea (Sharifat Salmani *et al.*, 2009).

Sardiñas *et al.* (2006) mostrou que OMV de *N. lactamica* podem ser utilizadas como carreador para vacinas com antígenos heterólogos. Neste estudo, o antígeno de superfície contra hepatite B (HBsAg) foi utilizado como modelo de antígeno para demonstrar a propriedade adjuvante de OMV de *N. lactamica.* OMV de *N. lactamica* e *N. meningitidis* B, coadministradas intranasalmente com HBsAg, modificou o padrão de subclasse e aumentou as respostas de IgG2a. Isto sugere que a utilização destas OMV como adjuvante de mucosas pode favorecer a indução de anticorpos com

atividade funcional aumentada contra o antígeno heterólogo, exercendo um efeito imunomodulador.

Uma outra aplicação importante, é o uso das OMV como carreadores de antígenos polissacarídeos. Atualmente, as vacinas comerciais existentes contra *Haemophilus influenza* utilizam o seu polissacarídeo (poli-ribitol-fosfato) como antígeno conjugado com proteínas carreadoras, entre elas, a anatoxina diftérica purificada, a toxina diftérica não tóxica recombinante CRM197, a anatoxina tetânica e as OMV de *N. meningitidis B.* (WHO, 2010).

OMV como vesículas produzidas por bactérias Gram-negativas, não se replicam. Além disso, contêm propriedades imuno estimulatórias intrínsecas devido às suas características naturais de formação e à sua composição (Ellis e Kuehn, 2010). Enquanto muitas nanopartículas são capazes de transferir antígenos a células apresentadoras de antígenos, a habilidade de propriamente estimular o sistema imune não é uma característica naturalmente presente nas nanopartículas. Por outro lado, as OMV têm propriedades para apresentar antígenos, além de propriedades adjuvantes, sendo uma estrutura com alto potencial para ser, o que hoje autores denominam, uma *plataforma vacinal* completa (Gerritzen *et al.*, 2017).

1.6. OMV: Processo de Obtenção

A vesiculação é um processo regulado. Desse modo, a produção de OMV com a finalidade de utilizá-las como insumo biotecnológico vem sendo controlada através das condições de cultivo do microrganismo, de indução de vias de resposta ao estresse, de superexpressão de proteínas periplasmáticas e, mais recentemente, por meio de controle genético (Kulp e Kuehn, 2010).

Na etapa de *upstream*, é essencial conhecer a cinética de cultivo, as exigências metabólicas, e o perfil de liberação das OMV, que pode variar dependendo das condições de cultivo e do meio de cultura (Van De Waterbeemd *et al.*, 2010;

Gonçalves, 2012; Santos *et al.*, 2012; Van Der Pol *et al.*, 2015). Por exemplo, para *Neisseria meningitidis* B, estudos mostraram que manter a cultura bacteriana até o final da fase exponencial e início da fase estacionária tem efeito positivo no rendimento de OMV (Gonçalves, 2012; Santos *et al.*, 2012; Van De Waterbeemd *et al.*, 2012; Salustiano, 2015).

Após o cultivo, as bactérias são removidas em geral por centrifugação (2000 – 10000 xg). Etapas de filtração também podem ser adicionadas ao processo de clarificação dependendo da pureza requerida ou da eficiência do primeiro processo (Klimentová e Stulík, 2015). A etapa seguinte é a concentração das OMV realizada através da ultracentrifugação (50.000 – 200.000 xg) do centrifugado/filtrado da cultura. (Van Der Pol *et al.*, 2015).

Na etapa de purificação, proteínas não associadas às OMV, bem como detergentes, caso estes sejam utilizados para extração das OMV, devem ser removidos (Klimentová e Stulík, 2015). OMV purificadas em geral são ressuspendidas em PBS e armazenadas a 4ºC. Estabilidade em longo prazo em soluções líquidas de OMV foi demonstrada com uso de crioprotetor (Holst *et al.*, 2009; Mullaney *et al.*, 2009; Asensio *et al.*, 2011; Van De Waterbeemd *et al.*, 2013).

Existem diferentes classificações para as OMV dependendo do modo que as vesículas são extraídas e/ou purificadas. OMV obtidas por processo que utiliza detergente para sua extração, com o objetivo de diminuir a quantidade de LPS tóxico nas vesículas, são denominadas dOMV (do inglês, *detergent* ou *detoxified OMV*) (Van De Waterbeemd *et al.*, 2010). Nesse processo de purificação, em geral utiliza-se o detergente deoxicolato (DOC) na presença de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Zoolinger *et al.*, (1979). No processo de purificação de nOMV (do inglês, *native OMV*), somente o agente quelante, como o EDTA, é utilizado para desestabilizar a membrana externa, estimulando a liberação de nOMV (do inglês, *supernatant* ou *spontaneous released OMV*) utiliza ultrafiltração ou ultracentrifugação para purificar OMV liberadas espontaneamente para o meio, sem que haja extração específica (Van De Waterbeemd *et al.*, 2010).

Vacinas com OMV em sua composição purificadas com uso de detergente (dOMV) tiveram sucesso no controle de surtos contra meningite B em países como Noruega, Cuba e Nova Zelândia (Fredriksen *et al.*, 1991; Sierra *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1998; Thornton *et al.*, 2006). Vacinas produzidas com nOMV têm apresentado resultados promissores, contudo, a alta concentração de LPS em sua composição, tem limitado a sua aplicação para vacinas (Drabick *et al.*, 1999; Saunders *et al.*, 1999; Katial *et al.*, 2002; Guthrie *et al.*, 2004). Em contrapartida, o desafio em utilizar sOMV, está no baixo rendimento dos processos de obtenção, o que acaba inviabilizando economicamente o desenvolvimento de vacinas com OMV e outras aplicações (Post *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2006)

Pesquisadores também têm desenvolvido técnicas de engenharia genética para otimizar o processo de obtenção de OMV livres de tratamento com detergentes. Como por exemplo, foi estabelecido que a deleção de genes específicos envolvidos com a biossíntese do lipídio A, como *lpxL1*, resultou na atenuação da toxicidade do LPS. Dessa forma, OMV provenientes de cepas com LPS atenuado não requerem extração com detergente, o que possibilitou recentemente o desenvolvimento de diferentes abordagens de obtenção de OMV livres de detergente (Van Der Ley *et al.*, 2001; Van De Waterbeemd *et al.*, 2012).

Características morfológicas das OMV, como o tamanho das vesículas obtidas, também devem ser levados em consideração uma vez que podem influenciar no desempenho e na eficiência das OMV em formulações vacinais (Xiang *et al.*, 2006; Gerritzen *et al.*, 2017). Por exemplo, na ativação do sistema imune, células apresentadoras de antígenos (APCs) como os macrófagos preferencialmente fagocitam partículas maiores (0,5 a 5 µm); enquanto que as células dendríticas (DCs) absorvem partículas no intervalo de tamanho de OMV e de *virus-like particles* (VLP), entre 20 e 200 nm (Xiang *et al.*, 2006). Kumar *et al.* (2015), em um estudo com nanopartículas de diferentes tamanhos e formatos, observou que partículas menores (até 193 nm) apresentavam em geral reposta imune com tendência Th1, enquanto partículas maiores (1530 nm) provocavam uma resposta imune com tendência Th2.

1.7. *N. lactamica*: Estudos do Cultivo, Produção de OMV e Aplicação Biotecnológica

O Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan de São Paulo – SP (IBu), nas últimas décadas, vem colaborando com o desenvolvimento de vacinas contra a doença meningocócica (*Neisseria meningitidis* B) e contra a pneumonia (*Streptococcus pneumoniae*), entre outras.

Atualmente, estudos direcionados à compreensão do metabolismo e das exigências nutricionais de *Neisseria* são escassos; sendo a maioria deles focada em pesquisas e cultivo de *N. meningitidis* B, espécie patogênica de importância global por ser responsável por causar a doença meningocócica, sepse, podendo levar os indivíduos à morte além de sequelas neurológicas importantes (Gold *et al.*, 1978; Baart *et al.*, 2007; Bennett *et al.*, 2010). Diante deste contexto, o grupo de pesquisa do IBu - Laboratório de Bioprocessos II, liderado pela Dra. Rocilda Schenkman, estudou nos anos 2000 o cultivo de *N. meningitidis* sorogrupo B em biorreatores, contribuindo para uma melhor compreensão da cinética de crescimento deste microrganismo e do perfil de liberação das suas OMV (Santos *et al.*, 2012).

Paralelamente, a versatilidade das OMV da espécie comensal *N. lactamica* e sua aplicação como antígeno potencial para o desenvolvimento de uma vacina contra meningite B começou a gerar interesse da comunidade científica (Oliver *et al.*, 2002; Gorringe *et al.*, 2005; Gorringe *et al.*, 2009; Salustiano, 2010a; Garcia, 2011a; Gonçalves, 2012). A partir de então, *N. lactamica* passou a ser cultivada pelo grupo da Dra. Schenkman em agitadores rotativos para a definição de parâmetros gerais de cultivo, estabelecimento de protocolos de preparo de inóculo, e definição de componentes essenciais do meio de cultura ao crescimento bacteriano. Com resultados promissores, foi possível iniciar cultivos em biorreatores (Gonçalves, 2008; Salustiano, 2010b; a; Garcia, 2011b; a). Esses ensaios possibilitaram conhecer melhor as exigências nutricionais de *N. lactamica* e estabelecer novas estratégias de cultivo que visassem à otimização da produtividade das OMV (Gonçalves, 2012). Com o melhoramento do rendimento das OMV, foi possível iniciar ensaios imunológicos comparativos de sua função antigênica contra a doença meningocócica do sorogrupo

B (Salustiano *et al.*, 2014). Nesta mesma época, surgiram na literatura trabalhos evidenciando o potencial uso das OMV de *N. meningitidis* e *lactamica* como adjuvante para vacinas (Sardiñas *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2014).

No início de 2015, com o objetivo de avaliar o potencial adjuvante das OMV de *N. lactamica,* o grupo da Dra. Schenkman, em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular do IBu, liderado pela Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, estabeleceu metodologia para avaliar a função adjuvante das OMV de *N. lactamica* em combinação com a proteína de superfície PspA5 de *Streptococcus pneumoniae*.

Streptococcus pneumoniae é a causa de infecções não invasivas como a pneumonia, a otite média e de doenças invasivas como a bacteremia e a meningite pneumocócica. Dados mais recente demonstram que crianças menores de cinco anos de idade representam o grupo mais afetado pela doença pneumocócica e estimativas apontam que o número de morte nesta faixa etária se mantém em torno de 476.000 em 2008 (WHO, 2012). Um efetivo meio de controle da doença é através da vacinação. Vacinas polissacarídicas, conjugadas ou não a componentes proteicos, têm apresentado proteção somente contra infecções causadas por sorotipos incluídos em sua composição, gerando uma pressão seletiva que tem levado à substituição dos sorotipos circulantes por outros não incluídos na formulação vacinal. Além disso, as vacinas polissacarídicas têm apresentado problemas de eficácia em crianças e em idosos, grupos de maior risco (Dagan, 2009). Dessa forma, nos últimos anos, diversos antígenos proteicos têm sido propostos como candidatos vacinais e a proteína de superfície A do pneumococo (do inglês *Pneumococcal Surface Protein* A, PspA) é possivelmente a mais bem estudada (Tai, 2006).

A PspA é um antígeno bem caracterizado, cuja proteção contra o pneumococo em modelos animais já foi verificada (Ferreira *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2010). No entanto, abordagens de uso como antígeno no desenvolvimento de vacinas contra a doença pneumocócica, até o momento, estão longe de ser consideradas ideais. Vacinas de subunidades proteicas apesar de oferecerem vantagens consideráveis em relação às tradicionais em termos de segurança e de custo de produção, na maioria dos casos possuem baixa imunogenicidade e requerem a adição de adjuvantes em sua composição (Reed *et al.*, 2009).

Até recentemente o uso de sais de alumínio, ou genericamente *alum*, representava o único adjuvante aprovado nos Estados Unidos (Mbow *et al.*, 2010). Sais de alumínio possuem bons níveis de segurança quando utilizados como adjuvantes para diversos antígenos, no entanto, estudos comparativos têm mostrado que este componente é um fraco adjuvante para a indução de anticorpos contra algumas subunidades proteicas e para imunidade mediada por células (Gupta, 1998).

Como o primeiro contato de *S. pneumoniae* e de *N. lactamica* com o indivíduo é pela mucosa nasal, espera-se que a formulação vacinal administrada via intranasal utilizando como adjuvante OMV de *N. lactamica* em baixa concentração de LOS, em combinação com a proteína PspA do clado 5 (PspA5) de *S. pneumoniae*, possa aumentar a resposta imune sistêmica contra o antígeno PspA, melhorando a proteção contra o pneumococo em desafios letais de morte.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Analisar a cinética de cultivo de *Neisseria lactamica* em cultivos descontínuos com a finalidade de melhorar o rendimento das vesículas de membrana externa (OMV) para utilizá-las em testes imunológicos para a avaliação da função adjuvante em combinação com a proteína de superfície PspA5 de *Streptococcus pneumoniae*.

2.2. Específico

- Analisar a cinética de crescimento de N. lactamica em cultivos descontínuos;
- Avaliar o perfil de liberação das vesículas de membrana externa (OMV) com a finalidade de melhorar o seu rendimento através de modificações no meio de cultura (fonte de carbono e de nitrogênio) ou nas condições de cultivo;
- Quantificar a concentração de produtos provenientes do metabolismo bacteriano tais como acetato e citrato, e também do substrato fonte de carbono (lactato);
- Definir a melhor condição de cultivo de N. lactamica para produção de OMV;
- Estabelecer as condições de remoção do excesso de lipooligossacarídeos (LOS), em diferentes concentrações de detergente, para utilizá-las em testes imunológicos;
- Avaliar o potencial adjuvante das OMV através da indução de anticorpos IgG e subclasses de IgGs (IgG1 e IgG2a) anti-PspA5 das formulações;

- Verificar a capacidade de ligação de anticorpos IgGs anti-PspA5 à superfície do pneumococo;
- Analisar a sobrevivência dos camundongos imunizados após desafio com S. pneumoniae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma a seguir (**Figura 2)** ilustra as etapas desde o cultivo de *N. lactamica* até o uso de suas OMV em testes imunológicos sobre função adjuvante.





Fonte: Adaptado de Gonçalves (2012).

3.1. Cultivo de Neisseria lactamica

3.1.1. Microrganismo

Em todos os cultivos realizados utilizou-se *Neisseria lactamica*, cepa N.799/98, liofilizadas em ampolas, provenientes do banco de cultura da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolf Lutz.

3.1.2. Meios de Cultura

O meio de ágar Müller-Hinton (Müller e Hinton, 1941), com 1% de soro equino foi utilizado para ativação inicial da cepa.

O meio de Catlin (Catlin, 1973), foi estabelecido como meio líquido "base" para todos os ensaios em agitador rotativo e para o preparo de inóculo em ensaios em biorreator. Este meio foi modificado, retirando o ferro de sua composição, porque foi demonstrado que a obtenção de OMV de *N. meningitidis* B, que apresentam proteínas reguladas pelo ferro em sua superfície, somente é possível na ausência deste íon (Santos, 2007). Neste trabalho, esse meio modificado será denominado MC e a composição do mesmo encontra-se no **Apêndice 1.**

O meio de Catlin também sofreu modificações na sua concentração de lactato e aminoácidos de acordo com o objetivo de cada ensaio. Em todos os cultivos, a concentração de lactato e de aminoácidos desse meio foi dobrada ou triplicada em relação à sua concentração original, além do acréscimo de extrato de levedura ultrafiltrado, BD/DifcoTM. No **Apêndice 1** encontra-se uma tabela com os meios utilizados e os valores correspondentes em g/L de cada componente modificado.

Gonçalves (2012) observou que *N. lactamica* não cresce somente em meio definido de Catlin, necessitando da adição de extrato de levedura em sua composição. Ressalta-se que embora o extrato de levedura seja uma substância complexa, seu uso é permitido na produção industrial de insumos biotecnológicos para uso humano. A porcentagem de aminoácidos livres, e a quantidade deles presente em 1,0 g de extrato de levedura são apresentados no **Apêndice 2.**

3.1.3. Lote Semente e Lote Trabalho

Lote semente: o conteúdo de uma ampola com o material liofilizado foi inoculado em placa de Petri com meio ágar Müller-Hinton (Müller e Hinton, 1941) com 1% de soro equino normal. A placa foi incubada sob atmosfera de 6-8% de CO₂, a 36°C por 20 horas. Após este período, as colônias foram ressuspendidas em meio Bacto Triptose Fosfato, marca BD (Franklin Lakes, New Jersey, EUA) e foi adicionado 30% de glicerol como crioprotetor, ao volume final. O material foi aliquotado em criotubos, congelados a -20°C por 12 - 24h e transferidos e mantido em nitrogênio líquido a -196°C.

Lote trabalho: a partir de um criotubo do lote semente foram feitas duas passagens em meio semissólido de ágar Müller-Hinton (Müller e Hinton, 1941) com 1% de soro equino normal. Na primeira passagem o cultivo foi de 18 horas e na segunda passagem, de 24 horas. Em ambas as condições, a temperatura foi de 36°C e atmosfera de 6-8% de CO₂. Ao final do cultivo, o conteúdo foi ressuspendido em meio de Catlin sem adição de ferro (MC modificado – **Apêndice 1**), contendo 1,0 g/L de extrato de levedura ultrafiltrado, YE, marca BD (Franklin Lakes, New Jersey, EUA), e 30% de glicerol na concentração final. O lote foi aliquotado em criotubos de 2,0 mL, e conservados em nitrogênio líquido a -196°C.

3.1.4. Ativação Inicial das Cepas

Criotubos do lote trabalho foram descongelados a 36°C e alíquotas dos mesmos foram inoculadas em tubos de tampa rosqueada, contendo meio de ágar Müller-Hinton com 1% de soro equino. Esses tubos foram incubados inclinados, por 30h a 36°C em câmera úmida sob atmosfera de 6-8% de CO₂.

3.1.5. Preparo do Inóculo

Após o período de 30h de incubação, o conteúdo dos tubos foi ressuspendido e transferido para meio líquido MC com 1,0 g/L de extrato de levedura, em erlenmeyers com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL de meio, e foram mantidos em agitador rotativo a 200rpm, 36°C, por 12h.

3.1.6. Cultivos em Biorreator: Parâmetros Físico-Químicos

O inóculo preparado em agitador rotativo foi transferido para o biorreator em volume suficiente para promover uma DO₅₄₀ inicial de 0,15. A dorna de 5L de capacidade (Bioflo® 2000, New Brunswick Scientific, NBS) foi esterilizada com tampão fosfato (PBS) a 121°C por 30 minutos. Para o interior do biorreator foram filtrados 4,2 L de meio utilizando-se o sistema de filtração esterilizante (Sistema Opticap, membrana de PVDF, Merck Millipore®), com membrana de porosidade 0,22 µm.

Durante o cultivo a temperatura, a agitação, o oxigênio dissolvido e o pH foram monitorados em tempo real a cada 30 segundos pelo programa LabView versão 7.1. Este programa foi desenvolvido pelo Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio), da Universidade Federal de São Carlos. A temperatura foi programada para ser mantida a 36°C; a agitação foi controlada automaticamente, variando de 250 a 850 rpm, de modo a manter a concentração de oxigênio em 30%. A pressão no biorreator foi de 0,2 bar e o pH inicial do meio de cultura foi 7,0.

3.1.7. Concentração Celular e Massa Seca

A concentração bacteriana foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm (DO₅₄₀) em amostras retiradas de hora em hora.

Para obtenção da massa seca, amostras de 50 mL coletadas a cada hora foram centrifugadas a 10.000rpm (15.417 x g), 10°C por 15 min. Os precipitados úmidos (massa bacteriana) foram secos em estufa a 60°C por cerca de 48h e pesados em balança de precisão. Com o objetivo de diminuir os efeitos da variabilidade que ocorreu nas medidas de massa seca na balança de precisão, foram feitos gráficos correlacionando DO_{540nm} e massa seca, e traçadas linhas de tendência assumindo a intersecção no ponto zero. Os gráficos encontram-se ilustrados no **Apêndice 4**. Foram considerados valores de R² maiores ou iguais a 0,9. A equação da reta de cada um dos experimentos foi utilizada para estimar os valores de massa seca (g/L) a partir dos valores de DO_{540nm}, que foram posteriormente utilizados para ilustrar a curva de crescimento celular e calcular a velocidade de crescimento e os fatores de conversão.

3.2. Delineamento dos Experimentos

3.2.1. Cultivo em Agitador Rotativo

Com a finalidade de verificar o crescimento bacteriano em diferentes concentrações de lactato no meio de Catlin, foi realizado, preliminarmente, um ensaio em agitador rotativo em seis diferentes concentrações de lactato, em duplicatas. O cultivo foi realizado em meio de Catlin com o dobro da concentração de aminoácidos (2AA) em relação à concentração original (vide **Apêndice 1**) e 2,0 g/L de extrato de levedura ultrafiltrado (2YE). As concentrações de lactato utilizadas foram: a concentração original de 6,0 g/L (1LA); 12,0 g/L (2LA); 18,0 g/L (3LA); 24,0 g/L (4LA); 30,0 g/L (5LA); e 36,0 g/L (6LA). As condições de cultivo foram 36°C, a 250 rpm, por 12h. A curva de crescimento foi estabelecida com base nos dados de DO₅₄₀ obtidos a cada hora. Ao término do cultivo, na 12ªh, o conteúdo de cada duplicata foi misturado, as OMV foram purificadas e dosadas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

3.2.2. Cultivos em Biorreator

Foram realizados 7 cultivos descontínuos, os quais tiveram a concentração de lactato e aminoácidos do meio de Catlin modificada e a adição de extrato de levedura. A **Tabela 2** mostra o meio de cultura e o tempo de cultivo utilizado em cada ensaio. Os ensaios 1, 2, 5 e 6 foram realizados em duplicata.

Nos ensaios 3 a 6 foram dados pulsos de aminoácidos e/ou lactato na 8ª hora de cultivo. No ensaio 7, os pulsos ocorreram na 6ª hora de cultivo. Os pulsos foram administrados em volume final de 40mL de uma solução de aminoácidos ou de lactato dissolvidos em solução dos sais do MC. A concentração dos componentes do pulso foi a mesma da concentração original do MC e considerou-se que no momento do pulso havia um volume de 4L de meio de cultivo no biorreator.

Ensaio	Moio de Culturo	Tempo de
		Cultivo
1	MC 3LA 3AA 3YE	12h
2	MC 3LA 2AA 2YE	12h
3	MC 3LA 2AA 2YE + pulso com aminoácidos (8ªh)	12h
4	MC 3LA 2AA 2YE + pulso com lactato (8 ^a h)	12h
5	MC 3LA 2AA 2YE + pulso com lactato (8 ^a h)	15h
6	MC 3LA 2AA 2YE + pulso com lactato e aminoácidos (8ªh)	15h
7	MC 3LA 2AA 2YE + pulso com lactato e aminoácidos (6ªh) com	10h
	borbulhamento de ar	

Tabela 2 - Meios de cultura utilizados em cada ensaio e tempo de cultivo. MC – meio de Catlin sem ferro (Catlin, 1973). LA – lactato. YE – extrato de levedura ultrafiltrado. A composição e a concentração de cada componente utilizado do meio utilizado nos ensaios 1-6 está ilustrada no Apêndice 1.

3.3. Vesículas de Membrana Externa (OMV)

3.3.1. Purificação e Dosagem

Após a retirada da massa bacteriana por centrifugação a 10.000 rpm (15.417 x g), 10°C, por 15 minutos, o sobrenadante contendo OMV, foi ultracentrifugado a 30.000 rpm (156.667 x g), 14°C, por 3h. O precipitado da ultracentrifugação, isto é, as OMV purificadas, foi ressuspendido em solução de 0,02% de azida. A concentração de OMV foi medida indiretamente através da dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), sendo a absorbância lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 750nm. O sobrenadante desse processo foi aliquotado e armazenado a -20°C para posterior análise de ácidos orgânicos.

3.3.2. Eletroforese

Amostras de 30µg de proteína (OMV) obtidas nos cultivos foram ressuspendidas em 10 µL de tampão de amostra que continha como agente denaturante 5% de mercaptoetanol e 4M de uréia. Foram preparados géis SDS-PAGE com 12,5% de acrilamida/ bisacrilamida. O gel foi corado com azul de Coomassie para verificar o perfil eletroforético das proteínas presentes nas OMV liberadas por *Neisseria lactamica* e para compará-las com os dados existentes na literatura.

3.3.3. Tratamento com Detergente

Para obtenção de um único lote de OMV para testes imunológicos, foi realizado um cultivo descontínuo de *N. lactamica* em meio MC 3LA 2AA 2YE por 14h. Ao final do cultivo, o conteúdo da dorna foi utilizado para separação das células e obtenção das OMV, por meio de centrifugação e ultracentrifugação respectivamente. Ao final do processo, cerca de 8,0 mg/mL das OMV foram ressuspendidas em azida 0,02% em volume final de 50mL.

Para remover o excesso de lipooligossacarídeos (LOS) das OMV para posterior avaliação em testes da função adjuvante, amostras de 8,0 mg de OMV foram ressuspendidas em volume final de 50mL de tampão Tris EDTA pH 8,0 (TE, 20mM Tris e 2mM EDTA) onde foi adicionado deoxicolato de sódio (DOC) nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% e foram novamente ultracentrifugadas. Tris EDTA pH 8,0 foi utilizado como controle. As OMV obtidas desta ultracentrifugação foram ressuspendidas em salina apirogênica em volume de 1,5mL e armazenadas em tubos de microcentrífuga apirogênicos a -20°C.

A dosagem de LOS foi realizada indiretamente através da dosagem de KDO (2-keto-3-deoxioctanato) das amostras tratadas. Para tanto, utilizou-se do método de Osborn (Osborn, 1963). Este método colorimétrico consiste na dosagem de KDO das amostras com base em uma curva padrão de KDO, feita por diluição seriada. Para análise da porcentagem de OMV recuperada após o tratamento, foi considerado 100% o total de OMV obtido após ultracentrifugação, na presença do tampão Tris EDTA pH 8,0, porém sem adição de DOC. As demais porcentagens de recuperação das OMV, foram calculadas tomando-se por base este valor.

3.3.4. Análise Morfológica

A morfologia das OMV foi observada em microscópio eletrônico de transmissão., inicialmente com a colaboração da Dra. Sylvia Mendes Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan e posteriormente, com a colaboração da Dra. Aurora Marques Cianciarullo do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

Foram analisadas as OMV de *N. lactamica* tratadas com Tris EDTA pH 8,0 (controle) e com 0,5% de deoxicolato de sódio em Tris EDTA pH 8,0, a fim de observar a morfologia das OMV tratadas com detergente, que foram utilizadas para ensaios imunológicos iniciais da função adjuvante.

Foi utilizada a técnica de contrastação negativa, seguindo o protocolo do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. Em grades de cobre de 300 meshes, recobertas por película de parlódio/carbono, foram aplicados 7µL de OMV em suspensão, para adsorção das OMV à película. Após 3 min, o excesso de líquido foi retirado com auxílio de papel de filtro e adicionou-se imediatamente 7µL de molibdato de sódio, pH 7,2 durante 10 segundos. Em seguida, retirou-se todo o líquido com papel filtro e deixou-se secar. As grades foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Alemanha), operado a 80 kV. As imagens foram capturadas por uma câmera CCD MegaView III por meio do programa iTEM-Universal TEM ImagingPlataform (Olympus Soft ImagingSolutionGMBh, Germany), e salvas em extensão TIF.

OMV de *N. lactamica* não tratadas e OMV tratadas somente com Tris EDTA pH 8,0 (controle) e tratadas com Tris EDTA pH 8,0 com deoxicolato de sódio nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5% foram analisadas posteriormente à realização dos ensaios imunológicos iniciais. Estas microscopias foram realizadas no Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

3.4. Análise de Ácidos Orgânicos

O sobrenadante da ultracentrifugação foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação de substrato fonte de carbono (ácidos orgânicos lactato, acetato e citrato), liberados no meio como produto do metabolismo.

Utilizou-se HPLC Shimadzu, modelo 10ADvp. As amostras obtidas durante o cultivo foram diluídas de duas a dez vezes com ácido sulfúrico 25 mM e filtradas em membrana com porosidade de 0,22 µm. A coluna utilizada foi Aminex® HPX-87H (BioRad, Hercules, California, EUA). Utilizou-se ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 60°C. O sistema de detecção utilizado foi UV com comprimento de onda de 210 nm. As concentrações do lactato, acetato e citrato foram calculadas através do software Class VP, versão 6.2 utilizando uma curva padrão para lactato e para ácidos orgânicos.

Determinou-se os fatores globais de conversão, produtividade em biomassa, produtividade em produto e velocidade específica de crescimento microbiano.

Os fatores de conversão foram definidos pelas seguintes expressões:

1. Fator de conversão do substrato em produto (mg/g):

$$Y_{p/s} = \frac{P_{máx} - P_i}{S_i - S_{pmáx}}$$
(1)

2. Fator de conversão do substrato em célula (g/g):

$$Y_{x/s} = \frac{X_{máx} - X_i}{S_i - S_{pmáx}}$$
(2)

3. Fator de conversão de célula em produto (mg/g):

$$Y_{p/x} = \frac{P_{máx} - P_i}{X_{máx} - X_i}$$
(3)

Onde:

Xmáx: concentração celular máxima;

Xi: concentração celular inicial;

Si: concentração de lactato inicial;

S_{pmáx}: concentração de lactato quando a concentração de OMV é máxima;

S_{xmáx}: concentração de lactato quando a concentração celular é máxima;

P_{máx}: concentração de OMV máxima;

Pi: concentração de OMV inicial.

Ressalta-se que os valores "iniciais" e "máximos" de cada variável nas equações 1-3 foram estabelecidos dentro do intervalo no qual o microrganismo encontra-se em fase exponencial de crescimento, e portanto, em atividade metabólica máxima. Esse intervalo, em todos os cultivos, ocorreu entre o instante inicial até a terceira hora do cultivo.

A produtividade global em biomassa e em produto foi calculada segundo as expressões:

4. Produtividade global em biomassa (g.cél/L.h):

$$\operatorname{Prod} X = \underbrace{X_{f} - X_{i}}_{t_{f} - t_{i}}$$
(4)

5. Produtividade global em produto (mg.OMV/L.h):

$$Prod P = \underbrace{P_{f} - P_{i}}_{t_{f} - t_{i}}$$
(5)

Onde:

X_f: concentração celular final;

Xi: concentração celular inicial;

Pf: concentração de OMV final;

Pi – concentração de OMV inicial;

t_f – tempo de cultivo;

t_i – tempo inicial igual a zero.

Foram calculadas também a produtividade máxima em biomassa e em produto a cada hora de cultivo. Para este cálculo, a produtividade foi calculada a cada instante, considerando como instante inicial, X_o e P_o. O maior valor obtido desta equação referese à quantidade máxima de OMV (mg) ou de célula (g) produzida por litro/hora de cultivo.

A velocidade específica de crescimento microbiano foi determinada a partir das curvas de concentração celular, de acordo com equação:

$$\mu_{x} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$
(6)

Onde:

µx: velocidade específica de formação de biomassa (h-1);
X: concentração celular (g/L);
dX: biomassa formada na intervala de termas "dt" (a);

dX: biomassa formada no intervalo de tempo "dt" (g);

dX/dt: derivada dos valores de concentração celular [g/(L.h)].

Foi calculado o logaritmo neperiano do crescimento bacteriano $ln (X/X_0)$ e os valores foram plotados em função do tempo. No intervalo de tempo em que o crescimento é exponencial (da hora zero à hora 3), e portanto, quando a velocidade específica de crescimento é constante, fez-se a regressão linear dos pontos e o coeficiente angular da equação da reta obtida corresponde à velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{xmáx}$) no cultivo. Gráficos ilustrados no **Apêndice 4**.

Para fins de análise e comparação entre os diferentes cultivos, foi feito um gráfico do perfil de formação de células (crescimento de *N. lactamica*) e de produto (OMV) através do logaritmo neperiano do crescimento bacteriano $\ln (X/X_0)$ e de formação de OMV $\ln (P/P_0)$. Os valores foram plotados em função do tempo. Gráficos ilustrados no **Apêndice 5**.

3.6. Ensaios Imunológicos

3.6.1. Soluções e Meios de Cultivo

As soluções e meio de cultivo utilizados para análise dos ensaios imunológicos estão descritos no **Apêndice 3**.

3.6.2. Experimento I e II: Cronograma de Imunização, Grupos e Formulações

Para avaliação da propriedade adjuvante de mucosa das vesículas de membrana externa (OMV) de *Neisseria lactamica* em combinação com a proteína heteróloga PspA do clado 5 de *Streptococcus pneumoniae*, foram realizados dois experimentos: Experimento I e Experimento II.

O protocolo de experimentação em animais deste projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob número 1152/13 (Experimento I) e 4938070815 (Experimento II).

Em ambos os experimentos foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, "Specific Pathogen Free", com 5 a 8 semanas de idade, produzidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O cronograma de imunização, desafio e coleta de soro encontra-se resumido na **Figura 3**: Figura 3 – Esquema do cronograma de imunização, desafio e coleta de soro. Experimento I e Experimento II.



A **Tabela 3** e a **Tabela 4** a seguir, ilustra o esquema de grupos e formulações para os experimentos I e II, respectivamente.

Grupo	po Formulação Descrição		Dose	
1	Salina	Salina apirogênica	10µL	
2		OMV: Vesículas de membrana externa	5 μα	
	0,5%	de <i>N. lactamica</i> tratada com DOC 0,5%	0 49	
3	PenA5	PspA5: Proteína A da superfície de	5 μα	
	1 30/10	pneumococo, clado 5	υμg	
4	PspA5- OMV _{t0,5%}	PspA5: Proteína A da superfície de	5 110	
		pneumococo, clado 5	5 µg	
		OMV: Vesículas de membrana externa	5 110	
		de N. lactamica tratada com DOC 0,5%	υμy	

Tabela 3 – Esquema de Grupos e formulações. Experimento I.

Grupo	Formulação	Descrição	Dose	
1	Salina	Salina apirogênica	10µL	
2	OMVpura	OMV: Vesículas de membrana externa de N.	5 µg	
	para	lactamica não tratada		
3	OMV _{t0,3%}	<u>OMV:</u> Vesículas de membrana externa de <i>N.</i>	5	
0		lactamica tratada com 0,3% DOC		
4	PspA5	PspA5: Proteína A da superfície de	5 µg	
		pneumococo, clado 5		
		PspA5: Proteína A da superfície de	5 µg	
5	PspA5-	pneumococo, clado 5		
	OMV _{pura}	<u>OMV:</u> Vesículas de membrana externa de <i>N.</i>		
		<i>lactamica</i> não tratada	5 µg	
6		PspA5: Proteína A da superfície de	5 µg	
	PspA5-	pneumococo, clado 5		
	OMV _{t0,3%}	<u>OMV:</u> Vesículas de membrana externa de <i>N.</i>		
lactamica tratada com 0,3% DOC				

Tabela 4 – Esquema de grupos e formulações. Experimento II.

O cronograma de imunização estabelecido foi de duas doses via nasal das diferentes formulações em volume final de 10μ L, administradas nos dias 0 e 15. Cada dose da vacina foi composta por 5µg de PspA5 ou 5µg de OMV (pura ou tratada com DOC) administradas sozinhas (grupos controle); ou formuladas com 5µg de OMV pura (grupo controle); ou com 5µg de OMV tratada (0,3% ou 0,5% DOC). A imunização via nasal foi conduzida após os animais serem anestesiados via intraperitoneal com 200µL de solução de 0,2% de xilazina (20 mg/kg) e 0,5% de quetamina (50 mg/kg) em salina apirogênica (**Figura 3**).

A proteína PspA5, utilizada como antígeno, foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira para a realização deste projeto. De acordo com a metodologia utilizada pelo laboratório da Dra. Oliveira, o fragmento que codifica a região N-terminal de PspA5 foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico da linhagem de pneumococo 122/02 (da coleção do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil) e clonado no vetor plasmidial pAE (Ramos *et al.*, 2004; Darrieux *et al.*, 2008). Este vetor permite a expressão da proteína heteróloga com uma cauda adicional de 6 resíduos de histidina (6XHis) na extremidade N-terminal, a fim de facilitar a sua purificação por cromatografia em resina quelante, previamente carregada com Ni2+ (Ramos *et al.*, 2004).

O excesso de LPS proveniente de *E. coli*, presente nas preparações de PspA5 foi extraído com Triton X-114 (Aida e Pabst, 1990) e a dosagem de PspA5 foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), lida absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

A linhagem bacteriana de *S. pneumoniae* ATCC6303 (sorotipo 3, PspA clado 5), utilizada no desafio letal, foi cultivada pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan (Oliveira *et al.*, 2010) e uma amostra do estoque de linhagens foi gentilmente cedida para a realização desse projeto. A cepa de *S. pneumoniae* ATCC6303 (sorotipo 3, PspA clado 5) foi cultivada em meio THY (meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura) líquido até atingir a fase exponencial (OD_{600nm} 0,4). As bactérias foram centrifugadas a 1500 g, por 20 min e suspensas em 1:10 do volume inicial, em meio contendo 15% de glicerol. Alíquotas de 100 µL foram mantidas a - 80°C.

3.6.3. Soro

Após 14 dias da primeira dose e 20 dias da segunda dose de acordo com o protocolo de imunização, o sangue foi coletado pelo plexo retrorbital, mantido a 37°C por 1h e centrifugado a 350 x g por 10 min, para obtenção do soro. Este foi mantido a -20°C.

3.6.4. Resposta imune contra o antígeno PspA5

A fim de avaliar a concentração de anticorpos IgG contra PspA5 no soro dos animais, utilizou-se o método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Placas de poliestireno com 96 poços (Maxisorp-Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos) foram sensibilizadas com 10µg/mL da proteína recombinante PspA5 diluída em tampão carbonato-bicarbonato e mantidas a 4°C *overnight*.

Para cálculo da concentração de anticorpos, curvas padrão de IgG, IgG1 ou IgG2a (Southern Biotech, Birmingham, AL, Estados Unidos) foram feitas em cada placa de acordo com o tipo de antígeno analisado.

Ao início de cada etapa, as placas foram lavadas por 3 vezes com uma solução tampão salina fosfato e 0,1% de Tween®20 (PBS-T, pH 7,4). Após o período de incubação a 4°C overnight, as amostras foram bloqueadas com uma solução de 10% de leite desnatado em PBS-T e incubadas em estufa a 37°C por 1h. Em seguida, as amostras de soro de cada animal foram diluídas, seriadamente, em PBS-T contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich). As placas foram mantidas a 37°C por 1h30. Subsequentemente, foi feita a incubação com anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo produzido em cabras (Southern Biotech), por 1h a 37°C. Por fim, anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (Southern Biotech) foi adicionado e após a incubação por 1h a 37ºC a reação foi revelada com solução de 10mg de o-phenilenediamina (OPD, Sigma Aldrich) em 20mL de tampão citrato fosfato, contendo 10µL de peróxido de hidrogênio. Entre as incubações, foram realizadas 3-5 lavagens das placas com PBS-T para a remoção de proteínas não ligadas às placas. A reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 8M por poço. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Thermo Scientific – Multiskan EX - Uniscience) a 492nm. A determinação da concentração dos anticorpos (em ng/mL) foi realizada com base nas curvas padrão de cada placa.

3.6.5. Resposta imune contra o antígeno OMV

Para avaliar se a formulação que utiliza OMV de *N. lactamica* também atua promovendo a indução de anticorpos anti-OMV de *N. meningitidis*, foram dosados anticorpos IgG provenientes do soro de camundongos do Experimento I/Grupo 2 (OMV_{t0,5%}) e Experimento I/Grupo 4 (PspA5-OMV_{t0,5%}), e do Experimento II/Grupos 5 (PspA5-OMV_{pura}) e Experimento II/Grupo 6 (PspA5-OMV_{t0,3%}).

A dosagem dos anticorpos anti-OMV de *N. meningitidis* foi realizada utilizando o mesmo método de ELISA descrito no tópico anterior. A sensibilização das placas (*coating*) foi feita com 3µg/mL de OMV de *N. meningitidis* cepa 44/89. Para controle positivo da reação, foi feita a sensibilização das placas com 3µg/mL de OMV de *N. lactamica* cepa N.799/98.

3.6.6. Ligação de anticorpos à superfície de S. pneumoniae

A capacidade da ligação dos anticorpos, presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados por via nasal, à superfície do pneumococo foi analisada *in vitro* por citometria de fluxo no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

S. pneumoniae da linhagem ATCC6303 foi cultivada em meio Todd-Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY) a 37°C até atingir DO_{600nm} de 0,5, conforme metodologia pré-estabelecida pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan (Oliveira *et al.*, 2010). Em seguida, a mesma foi centrifugada a 3200 x g por 10min e lavada com PBS. A bactéria foi ressuspendida em PBS e 95µL desta suspensão bacteriana foram incubados com 5µL dos soros dos camundongos imunizados (reunidos em pools de cada grupo), por 30min a 37°C. Logo após, foi novamente lavada com PBS e suspendida em 100µL de PBS contendo anti-IgG de camundongos conjugados a FITC (isotiocianato de fluoresceína, MP Biochemicals, Irvine, CA, Estados Unidos), na diluição de 1:100 (v/v). Por fim, as amostras foram incubadas no gelo e no escuro por 30 min, lavadas com PBS e a

bactéria foi fixada com 200µl de solução BD Cytofix TM (BD Biosciences). Análises de citometria de fluxo foram feitas em aparelho FACS Canto II (BD Biosciences), com a contagem de 10000 bactérias. Os dados foram analisados utilizando o programa Flow Jo 7.6.1 (Tree Star). Este experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, sob a supervisão do Dr. Jorge Mário da Costa Ferreira Jr.

3.6.7. Desafio respiratório letal com S. pneumoniae

Vinte e um dias após a imunização, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de 0,2% (20 mg/kg) de xilazina e 1,0% (100 mg/kg) de quetamina e receberam por via nasal 50µL de suspensão contendo 3.10⁵ de bactérias *S. pneumoniae* ATCC6303 (sorotipo 3, PspA clado 5). A sobrevivência dos animais foi acompanhada por 10 dias.

3.6.8. Análises Estatísticas

A análise estatística dos níveis de anticorpos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. A sobrevivência foi analisada por curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer. Em todos os casos, p≤ 0,05 foi considerado estatisticamente diferente. Os gráficos e análises foram realizados pelo programa Prism Graph-Pad 5.03.

4. RESULTADOS

A **Tabela 5** abaixo mostra um resumo de todos os cultivos deste estudo, com a finalidade de facilitar a apresentação dos resultados a seguir.

Tabela 5 – Resumo dos meios de cultura e tempo de cultivo dos ensaios em agitador rotativo e biorreator.

		Meio de Catlin				Tompo
Ensaio	Grupo	Concentração de lactato	Concentração de aminoácidos	Concentração de YE	Pulso	de cultivo
Agitador Rotativo	-	Variado	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	-	12h
	А	18,0 g/L (3LA)	triplo (3AA)	3,0 g/L (2YE)	-	12h
	В	18,0 g/L (3LA)	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	-	12h
Biorreator	С	18,0 g/L (3LA)	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	Aminoácidos 8ª hora	12h
	D	18,0 g/L (3LA)	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	Lactato 8ª hora	12h
	Е	18,0 g/L (3LA)	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	Lactato 8ª hora	15h
	F	18,0 g/L (3LA)	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	Lactato e aminoácidos 8ª hora	15h
	G	18,0 g/L (3LA)	dobro (2AA)	2,0 g/L (2YE)	Lactato e aminoácidos 6ª hora	10h
4.1. Ensaio em Agitador Rotativo

Neste ensaio, foram realizados cultivos com o meio de Catlin com o dobro da concentração de aminoácidos (2AA) em relação à concentração original (**Apêndice 1**) e 2,0 g/L de extrato de levedura ultrafiltrado (2YE). As concentrações de lactato utilizadas foram: a concentração original (1LA, 6,0 g/L), o dobro (2LA, 12,0 g/L), o triplo (3LA, 18,0 g/L), quatro vezes (4LA, 24,0 g/L), cinco vezes (5LA, 30,0 g/L) e seis vezes (6LA, 36,0 g/L). O tempo de cultivo foi de 12h. Os resultados de cada condição encontram-se na **Tabela 6**, **Figura 4** e **Figura 5**.

Neste ensaio, o melhor crescimento de *N. lactamica*, e o melhor rendimento de OMV obtido em 12h de cultivo, foi de 3,11 (DO₅₄₀) na 11^a hora de cultivo (**Tabela 6**), e 79mg/L de OMV (**Figura 5**), observados na condição do meio MC 3LA2AA2YE.

Tempo	MC	MC	MC	MC	MC	MC
(h)	1LA2AA2YE	2LA2AA2YE	3LA2AA2YE	4LA2AA2YE	5LA2AA2YE	6LA2AA2YE
0	0,14	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14
1	0,30	0,34	0,35	0,30	0,29	0,27
2	0,59	0,72	0,69	0,65	0,62	0,57
3	0,97	1,15	1,13	1,10	1,05	0,95
4	1,30	1,51	1,58	1,35	1,41	1,39
5	1,66	1,79	1,74	1,71	1,68	1,73
6	1,93	1,93	1,95	1,93	1,81	1,87
7	2,14	2,26	2,14	2,07	2,04	1,93
8	2,44	2,48	2,35	2,27	2,23	2,04
9	2,42	2,52	2,49	2,31	2,31	2,22
10	2,52	2,79	2,84	2,63	2,49	2,44
11	2,68	2,86	3,11	2,89	3,01	2,80
12	2,15	2,84	2,87	2,49	2,52	2,48

Tabela 6 – Crescimento de *N. lactamica* (DO_{540}) em agitador rotativo. MC (meio de Catlin); LA (lactato); AA (aminoácidos); YE (extrato de levedura).

Figura 4 – Curva de crescimento de *N. lactamica* (DO₅₄₀) em agitador rotativo. 1. MC 1LA2AA2YE; 2. MC 2LA2AA2YE; 3. MC 3LA2AA2YE; 4. MC 4LA2AA2YE; 5. MC 5LA2AA2YE; 6. MC 6LA2AA2YE.



Figura 5 – Rendimento de OMV de *N. lactamica* (mg/L) em agitador rotativo. 1. MC 1LA2AA2YE; 2. MC 2LA2AA2YE; 3. MC 3LA2AA2YE; 4. MC 4LA2AA2YE; 5. MC 5LA2AA2YE; 6. MC 6LA2AA2YE.



4.2. Ensaios em Biorreator

Com o objetivo de confirmar e dar continuidade aos estudos de crescimento de *N. lactamica* e de rendimento das OMV realizados em agitador rotativo, inicialmente foram planejados os ensaios em biorreator dos Grupos A e B. Os ensaios do Grupo A foram realizados em cultivo descontínuo por 12h, utilizando meio de Catlin (MC) com o triplo da concentração original de lactato, o triplo da concentração original de aminoácidos e 3,0 g/L de extrato de levedura (**Apêndice 1**). Esta condição de cultivo foi denominada MC 3LA3AA3YE (12h). Os ensaios do Grupo B foram realizados em cultivo descontínuo por 12h, utilizando meio de Catlin (MC) com o triplo da concentração original de lactato, o dobro da concentração original de aminoácidos e 2,0 g/L de extrato de levedura (**Apêndice 1**). Esta condição de cultivo será denominada MC 3LA2AA2YE (12h) no decorrer do texto. Em ambos os grupos, os valores apresentados referem-se à média de dois ensaios cada.

4.2.1. Grupo A: MC 3LA3AA3YE (12h)

A **Tabela 7** apresenta os valores experimentais médios de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 6** a seguir apresenta a curva média dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração de lactato (g/L), acetato e citrato durante as 12h de cultivo e a **Figura 7** ilustra os dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real.

Nesse experimento, o maior crescimento celular foi observado na 11^a hora de cultivo, atingindo 3,61 g/L de massa seca e 7,08 de DO₅₄₀. A maior concentração de OMV foi de 325,93 mg/L, na 12^a hora. A concentração inicial de lactato no meio foi de 17,05 g/L, este foi consumido durante todo o cultivo, atingindo valor mínimo de 0,41 g/L na 11^a hora. O acetato foi produzido ao longo do cultivo, partido de 0,3 g/L atingindo concentração máxima de 5,55 g/L na 11^a hora. A concentração de citrato foi oscilante e de baixa amplitude, inicialmente 0,43 g/L, teve um pequeno aumento, depois atingiu a concentração mínima de 0,38 g/L na 7^a hora, e voltou a subir para

0,40 g/L. A agitação permaneceu no valor máximo estipulado, 850 rpm, entre a 3ª e a 10ª hora. O oxigênio dissolvido teve seus menores valores, 0,6-0,4% entre a 3ª e a 10ª hora e voltou a subir na 11ª hora para 37%. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 8,41 no final do cultivo

Tabela 7 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T°C), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo A: MC 3LA3AA3YE (12h).

Tempo		T 10		O ₂ D	DO	massa	OMV	Lactato	Acetato	Citrato
(h)	рн	1°C	rpm	(%)	DO ₅₄₀	seca	(mg/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
						(g/L)				
00	7,13	36	298	19,1	0,17	0,09	1,89	17,05	0,13	0,43
01	7,09	36	377	23,9	0,42	0,21	3,26	15,82	0,20	0,41
02	7,08	36	624	25,0	1,02	0,52	4,03	16,06	0,42	0,55
03	6,62	36	850	0,5	1,84	0,94	5,61	15,31	0,78	0,45
04	7,12	36	850	0,6	2,69	1,37	15,56	14,01	1,17	0,41
05	7,06	36	851	0,5	3,48	1,78	25,00	12,61	1,69	0,41
06	7,19	36	850	0,4	4,39	2,23	30,90	11,54	2,58	0,44
07	7,30	36	850	0,4	4,72	2,40	64,49	8,41	2,90	0,38
08	7,42	36	850	0,4	5,25	2,67	89,23	6,69	3,81	0,39
09	7,50	36	850	0,4	6,02	3,07	118,48	4,27	4,64	0,40
10	7,62	36	850	0,4	5,24	2,67	228,99	1,88	5,36	0,40
11	8,04	36	778	37,5	7,08	3,61	263,30	0,41	5,55	0,41
12	8,41	36	636	29,6	6,97	3,55	325,93	0,43	5,13	0,40

Figura 6 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA3AA3YE (12h).



Figura 7 – Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (ºC) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA3AA3YE (12h).



4.2.2. Grupo B: MC 3LA2AA2YE (12h)

A **Tabela 8** apresenta os valores experimentais médios de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 8** a seguir apresenta a curva média dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetato e citrato durante as 12h de cultivo e a **Figura 9** ilustra os dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real.

O maior crescimento celular foi observado na 11ª hora de cultivo, atingindo 3,71 g/L de massa seca e 6,66 de DO₅₄₀. A maior concentração de OMV foi de 340,43 mg/L, também na 11ª hora. A concentração inicial de lactato no meio foi de 17,15 g/L, este foi consumido durante o cultivo, atingindo valor mínimo de 0,19 g/L na 11ª hora. O acetato foi produzido ao longo do cultivo, atingindo concentração máxima de 5,64 g/L na 12ª hora. A concentração de citrato foi oscilante e de baixa amplitude, inicialmente 0,44 g/L e na 7ª hora teve sua concentração mínima de 0,37 g/L, voltando a subir até a 10ªh. A agitação permaneceu no valor máximo estipulado, 850 rpm, entre a 2ª e a 10ª hora. O oxigênio dissolvido teve seu menor valor, 0,1%, entre a 3ª e a 10ª hora de cultivo e voltou a subir na 11ª hora para cerca de 30%. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 8,29 ao final do cultivo.

Tabela 8 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T°C), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo B: MC 3LA2AA2YE (12h).

Tempo		TOC		O ₂ D	DO	massa	OMV	Lactato	Acetato	Citrato
(h)	рп	PC	rpm	(%)	D O 540	(g/L)	(mg/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
00	7,13	36	265	1,1	0,18	0,10	3,22	17,15	0,14	0,44
01	7,12	36	390	25,9	0,39	0,21	10,29	15,13	0,20	0,45
02	7,12	36	582	32,8	0,88	0,49	7,42	15,79	0,42	0,48
03	6,93	36	851	0,1	1,43	0,80	7,86	15,74	0,67	0,48
04	6,95	36	850	0,1	2,33	1,30	13,19	14,33	1,24	0,43
05	7,07	36	850	0,1	2,81	1,56	21,49	12,25	1,59	0,40
06	7,16	36	850	0,1	3,32	1,85	65,16	11,43	2,54	0,43
07	7,24	36	851	0,1	4,26	2,38	142,29	7,96	2,91	0,37
08	7,37	36	850	0,1	4,90	2,73	172,87	5,92	4,09	0,42
09	7,47	36	850	0,1	5,59	3,11	204,26	2,90	4,91	0,46
10	7,70	36	852	0,1	5,08	2,83	244,95	0,31	5,67	0,47
11	8,22	36	660	30,0	6,66	3,71	340,43	0,19	5,59	0,44
12	8,29	36	399	31,2	5,62	3,13	277,13	0,20	5,64	0,43



Figura 8 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (12h).

Figura 9 – Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (ºC) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (12h).



4.2.3. Grupo C: MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso AA 8^ah

O ensaio do Grupo C foi realizado em cultivo descontínuo por 12h, utilizando meio de Catlin (MC) com o triplo da concentração original de lactato, o dobro da concentração original de aminoácidos e 2,0 g/L de extrato de levedura (**Apêndice 1**) e com um pulso de aminoácidos na 8ª hora de cultivo. Este experimento foi realizado em paralelo com o ensaio do grupo D e não há valores de duplicata nestes dois ensaios. Esta condição de cultivo será denominada MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso AA 8ªh no decorrer do texto.

A **Tabela 9** apresenta os valores experimentais de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 10** a seguir apresenta a curva dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetato e citrato durante as 12h de cultivo e a **Figura 11** ilustra os dados de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real.

Nesse experimento, o maior crescimento celular foi observado na 11^a hora de cultivo, atingindo 3,39 g/L de massa seca e 6,71 de DO₅₄₀. A maior concentração de OMV foi de 248,94 mg/L, na 12^a hora. A concentração inicial de lactato foi de 17,26 g/L, e este foi consumido durante todo cultivo, atingindo valor mínimo de 0,13 g/L na 12^a hora. O acetato foi produzido ao longo do cultivo, atingindo concentração máxima de 5,73 g/L na 11^a hora. A concentração de citrato foi oscilante e com baixa amplitude, variou de 0,44 g/L a 0,40 g/L. A agitação permaneceu no valor máximo estipulado, 850 rpm, entre a 2^a e a 11^a hora. O oxigênio dissolvido apresentou seus menores valores, < 0,6%, entre a 3^a - 10^a hora de cultivo e voltou a subir na 11^a hora para cerca de 30%. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 7,43 ao final do cultivo.

Tabela 9 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T^oC), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo C: MC <u>3LA2AA2YE (12h) + pulso AA 8^ah.</u>

Tempo				O ₂ D		massa	OMV	Lactato	Acetato	Citrato
(h)	pH T⁰C rpm		(%)	DO ₅₄₀	seca	(ma/l)				
(1)				(70)		(g/L)	(iiig/L)	(g/=)	(g/=)	(g/Ľ)
00	7,25	36	284	0,1	0,16	0,08	2,6	17,26	0,15	0,44
01	7,13	36	444	31,5	0,37	0,19	2,4	17,15	0,19	0,44
02	7,03	36	701	21,8	0,80	0,40	5,5	16,56	0,32	0,43
03	6,98	36	847	0,3	1,49	0,75	4,2	15,69	0,66	0,41
04	7,04	36	849	0,2	2,22	1,12	8,4	14,67	1,10	0,41
05	7,15	36	848	0,3	2,68	1,35	13,1	12,78	1,58	0,40
06	7,27	36	850	0,4	3,21	1,62	39,0	11,30	2,22	0,41
07	7,35	36	849	0,6	3,63	1,84	66,0	8,99	2,87	0,40
08	7,43	36	850	0,6	4,14	2,10	87,2	7,08	3,49	0,40
09	7,57	36	849	0,5	6,15	3,11	151,6	4,56	4,37	0,41
10	7,66	36	851	0,5	6,05	3,06	166,0	2,67	4,98	0,41
11	7,82	36	849	30,1	6,71	3,39	230,3	0,14	5,73	0,41
12	7,43	36	598	30,0	6,11	3,09	248,94	0,13	5,67	0,42

Figura 10 – Curva dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (12h) com pulso de aminoácidos na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado.



Figura 11 – Dados de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (12h) com pulso de aminoácidos na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado.



4.2.4. Grupo D: MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso LA 8^ah

O ensaio do Grupo D foi realizado em cultivo descontínuo por 12h, utilizando meio de Catlin (MC) com o triplo da concentração original de lactato, o dobro da concentração original de aminoácidos e 2,0 g/L de extrato de levedura (**Apêndice 1**) e com um pulso de lactato na 8ª hora de cultivo. Este experimento foi realizado em paralelo com o ensaio do grupo C, portanto não há valores de duplicata nestes dois ensaios. Esta condição de cultivo será denominada MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso LA 8ªh no decorrer do texto.

A **Tabela 10** apresenta os valores experimentais de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 12** a seguir apresenta a curva dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetato e citrato durante as 12h de cultivo e a **Figura 13** ilustra os dados de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real.

Nesse experimento, o maior crescimento celular foi observado na 12^a hora de cultivo, atingindo 3,22 g/L de massa seca e 6,16 de DO₅₄₀. A maior concentração de OMV foi de 273,90 mg/L, também na 12^a hora. A concentração inicial de lactato no meio foi de 17,79 g/L, e este foi consumido durante todo cultivo. Foi administrado pulso de 6,0 g/L de lactato logo após a mensuração dos parâmetros da 8^a hora. A concentração na 9^a hora atingiu 10,71 g/L, e o valor mínimo de 3,80 g/L foi observado na 12^a hora. O acetato foi produzido ao longo do cultivo, atingindo concentração máxima de 6,13 g/L na 12^a hora. A concentração de citrato foi oscilante de 0,50 g/L(2^ah) a 0,37 g/L (7^ah). A agitação se manteve em 850 rpm a partir da 2^a hora até o final do cultivo. A partir da 3^a hora de cultivo, a concentração de oxigênio caiu de 24,9% para 5,4% e manteve-se com valor médio de 4,2% até o final do cultivo. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 7,48 ao final do cultivo.

Tabela 10 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T^oC), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo D: MC 3LA2AA2YE (12h) + pulso LA 8^ah.

Tempo			m ^O ₂D ^T °C rpm ^O ₂D ^(%) ^{DO} ₅₄₀ s			massa	OMV	Lactato	Acetato	Citrato
(h)	рН	т⁰С			seca	(mg/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	
				()		(g/L)	,			
00	7,07	36	251	45,1	0,16	0,08	3,4	17,79	0,16	0,46
01	6,98	36	417	30,6	0,33	0,17	2,9	17,04	0,18	0,50
02	6,87	36	586	24,9	0,75	0,39	3,9	14,83	0,29	0,38
03	6,82	36,4	849	5,4	1,37	0,71	3,7	16,15	0,62	0,42
04	6,88	36	850	4,9	2,14	1,12	9,9	15,19	1,07	0,42
05	6,97	36	850	4,7	2,36	1,23	19,8	12,89	1,43	0,39
06	7,08	36	850	4,7	2,98	1,56	30,2	11,40	1,95	0,39
07	7,14	36	851	4,7	4,16	2,18	59,6	9,08	2,45	0,37
08	7,22	36	849	4,3	4,24	2,22	82,7	8,02	3,31	0,41
09	7,57	36	849	0,5	5,52	2,89	139,9	10,71	3,96	0,39
10	7,41	36,1	850	4,2	5,45	2,85	171,8	9,00	4,24	0,38
11	7,42	36,1	850	4,2	5,70	2,98	200,5	7,26	5,10	0,41
12	7,48	36	850	4,3	6,16	3,22	273,90	3,80	6,13	0,43

Figura 12 – Curva dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (12h) com pulso de lactato na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado.



Figura 13 – Dados de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (12h) com pulso de lactato na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado.



4.2.5. Grupo E: MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA 8^ah

Os ensaios do Grupo E foram realizados em cultivo descontínuo por 15h, utilizando meio de Catlin (MC) com o triplo da concentração original de lactato, o dobro da concentração original de aminoácidos e 2,0 g/L de extrato de levedura (**Apêndice** 1) e pulso de lactato na 8ª hora de cultivo. Os valores apresentados referem-se à média de dois ensaios. Esta condição de cultivo será denominada MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA 8ªh no decorrer do texto.

A **Tabela 11** apresenta os valores experimentais de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 14** a seguir apresenta a curva média dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetato e citrato durante as 15h de cultivo e a **Figura 15** ilustra os dados médios de agitação (rpm) e temperatura (°C). A aferição do pH foi feita manualmente nas amostras retiradas a cada hora da dorna 1 e a sonda de oxigênio dissolvido da dorna 2 não estava funcionando corretamente, portanto neste gráfico foram considerados somente os valores de oxigênio dissolvido da dorna 1.

Esses ensaios tiveram como objetivo acompanhar o crescimento de *N. lactamica*, no meio MC 3LA2AA2YE com um pulso de lactato na 8^a hora de cultivo, até uma hora após a taxa de oxigênio dissolvido no meio aumentar subitamente, indicando diminuição da taxa de respiração celular. Como pode ser observado na **Figura 14**, tal aumento ocorreu por volta da 14^a hora, portanto o cultivo foi realizado até a 15^a hora.

Nesta condição, houve crescimento bacteriano até a 13^a hora de cultivo, quando o crescimento celular foi de 3,49 g/L de massa seca e 6,87 de DO₅₄₀. A maior concentração de OMV foi de 318,60 mg/L na 15^a hora. A concentração inicial de lactato no meio foi de 17,31 g/L, e este componente foi consumido durante todo cultivo. Foi administrado pulso de 6,0 g/L de lactato logo após a retirada de amostras da 8^a hora. A concentração na 9^a hora atingiu 15,67 g/L, e a partir da 14^ahora não foi detectada concentração de lactato residual. O acetato foi produzido ao longo do cultivo, atingindo concentração máxima de 7,36 g/L na 14^a hora. A concentração de

citrato foi oscilante, inicialmente 0,46 g/L, atingiu concentração de 0,69 g/L na 9ª hora, na 10ª hora houve um declínio para 0,03 g/L, e na 14ª hora atingiu valor máximo de 1,26 g/L. A agitação permaneceu no valor máximo estipulado, 850 rpm, entre a 2ª e a 12ª hora. A concentração de oxigênio dissolvido caiu de 23,7% na 2ª hora para 3,1% na 3ª hora, e manteve-se baixa (< 1,1%) até a 9ª hora, quando se observa um aumento gradual desta concentração que atinge 30,1% na última hora do cultivo. O valor máximo observado foi de 38,9% na 14ª hora. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 8,46 ao final do cultivo.

Tabela 11 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T°C), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo E: MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA 8^ah

Tempo				O₂D		massa	ΟΜΥ	Lactato	Acetato	Citrato
(h)	рН	т⁰С	rpm	(%)	DO ₅₄₀	seca	(ma/l)	(a/L)	(a/L)	(a/l)
(1)				(70)		(g/L)	(119, 2)	(9, –)	(9, –)	(g/ =)
00	7,10	36	430	9,7	0,19	0,10	6,60	17,31	0,15	0,46
01	7,03	36	813	23,7	0,38	0,19	6,36	16,81	0,22	0,57
02	6,96	36	851	3,1	0,80	0,40	6,97	16,40	0,40	0,61
03	7,01	36	851	0,8	1,49	0,76	6,72	15,23	0,67	0,62
04	7,11	36	851	0,8	2,12	1,08	13,10	14,07	1,02	0,62
05	7,19	36	851	0,9	2,66	1,35	32,61	13,06	1,46	0,62
06	7,29	36	850	1,0	3,09	1,57	45,55	11,23	1,95	0,60
07	7,38	36	851	1,1	4,26	2,16	97,67	8,23	2,33	0,52
08	7,49	36	850	1,0	4,87	2,47	98,97	6,25	2,95	0,48
09	7,48	36	849	4,3	5,53	2,81	188,10	15,67	3,80	0,69
10	7,61	36	850	5,9	5,97	3,03	205,69	10,57	5,44	0,03
11	7,68	36	851	7,0	6,38	3,24	180,00	5,13	5,34	0,09
12	7,74	36	851	16,2	6,55	3,32	235,36	1,45	6,07	0,19
13	7,72	36	804	11,3	6,87	3,49	274,21	0,05	7,19	0,06
14	8,19	36	552	38,9	6,54	3,33	285,24	0,00	7,36	1,26
15	8,46	36	290	30,1	4,86	2,47	318,60	0,00	7,32	1,08

Figura 14 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (15h) com pulso de lactato na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado.



Figura 15 – Dados médios de agitação (rpm) e temperatura (°C) obtidos em tempo real. Dados de oxigênio dissolvido (%) são provenientes somente da dorna 2 e o pH da dorna 1 foi aferido manualmente. MC 3LA2AA2YE (15h) com pulso de lactato na 8ª hora. A seta representa o momento em o pulso foi dado.



4.2.6. Grupo F: MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA e AA 8^ah

O objetivo dos cultivos do Grupo F foi analisar o crescimento de *N. lactamica* e o rendimento das OMV em meio MC 3LA2AA2YE acrescido de pulso de lactato e de aminoácidos na 8ª hora de cultivo até a taxa de oxigênio dissolvido no meio aumentar significativamente, indicando queda da taxa de respiração celular. Os valores apresentados referem-se à média de dois ensaios. Esta condição de cultivo será denominada MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA e AA 8ªh no decorrer do texto.

A **Tabela 12** apresenta os valores experimentais de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 16** a seguir apresenta a curva média dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetato e citrato durante as 12h de cultivo e a **Figura 17** ilustra os dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real.

Em relação à curva de crescimento bacteriano, nesta condição a massa seca atingiu 4,28 g/L na 15^a hora de cultivo e 6,72 de DO₅₄₀. No que diz respeito ao rendimento das OMV, este foi máximo na 14ª hora, 364,14 mg/L. A concentração inicial de lactato no meio foi de 15,89 g/L, e este componente foi consumido durante todo cultivo. Foi administrado pulso de 6,0 g/L de lactato logo após a mensuração dos parâmetros da 8ª hora. A concentração de lactato na 9ª hora atingiu 12,77 g/L, e o valor mínimo de 0,35 g/L foi observado na 15ª hora. O acetato foi produzido ao longo do cultivo, atingindo concentração máxima de 7,65 g/L na 15ª hora. A concentração de citrato foi oscilante, inicialmente em 0,40 g/L, atingiu concentração de 0,60 g/L na 2^a hora, em seguida houve queda da concentração para 0,37 g/L(5^ah), e na 14^a hora houve um ligeiro aumento, atingindo valor máximo de 0,63 g/L na última hora. A agitação permaneceu no valor máximo estipulado, 850 rpm, entre a 2ª e a 13ª hora. A concentração de oxigênio dissolvido permaneceu baixa (< 1,4%) entre a 3ª e 13ª hora de cultivo. A partir da 14^a hora observa-se um aumento na concentração de O₂D para cerca de 30%. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 8,32 ao final do cultivo.

Tabela 12 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T°C), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo F: MC 3LA2AA2YE (15h) + pulso LA e AA 8^ah massa Tempo O_2D OMV Lactato Acetato Citrato T⁰C rpm рΗ **DO**₅₄₀ seca /0/ \ /h\ . л١ . л١ . ۰. ۱۱ (a/I)

(n)				(%)		(g/L)	(mg/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
00	7,14	36	300	3,8	0,15	0,09	3,10	15,89	0,11	0,40
01	7,04	36	468	28,3	0,34	0,22	1,38	16,95	0,17	0,49
02	6,93	36	842	10,2	0,75	0,48	1,12	15,81	0,32	0,60
03	6,88	36	850	1,4	1,49	0,95	2,50	15,24	0,63	0,50
04	6,97	36	850	1,2	1,91	1,21	6,21	13,62	0,92	0,38
05	7,06	36	850	1,3	2,58	1,64	15,52	12,53	1,32	0,37
06	7,15	36	850	1,3	2,89	1,84	15,86	11,91	1,87	0,39
07	7,20	36	851	1,4	2,94	1,87	43,10	10,08	2,47	0,40
08	7,32	36	850	1,4	3,55	2,26	50,86	8,20	3,19	0,40
09	7,36	36	851	1,2	4,35	2,77	96,55	12,77	3,54	0,39
10	7,45	36	851	1,1	4,65	2,96	122,41	11,14	4,07	0,40
11	7,48	36	850	1,1	4,86	3,09	113,79	9,14	4,75	0,41
12	7,56	36	850	1,1	5,72	3,64	310,69	6,18	6,02	0,40
13	7,66	36	850	1,0	6,10	3,88	284,14	2,06	7,06	0,48
14	8,10	36	460	32,6	6,53	4,16	364,14	0,46	7,62	0,60
15	8,32	36	385	30,0	6,72	4,28	313,62	0,35	7,65	0,63

Figura 16 – Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (15h) com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. As setas representam o momento em que os pulsos foram dados.



Figura 17 – Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (15h) com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. As setas representam o momento em os pulsos foram dados.



4.2.7. Grupo G: MC 3LA2AA2YE (10h) + borbulhamento de ar + pulso LA e AA 6h

No Grupo G foi realizado cultivo descontínuo por 10h, em duplicata, utilizando meio de Catlin (MC) com o triplo da concentração original de lactato, o dobro da concentração original de aminoácidos e 2,0 g/L de extrato de levedura e pulso de lactato e de aminoácidos na 6^a hora de cultivo. Exclusivamente neste cultivo, a aeração foi programada para ser por borbulhamento e ao longo do cultivo este parâmetro foi controlado para se manter na taxa de 30%. Os valores apresentados referem-se à média dos dois ensaios. Esta condição de cultivo será denominada MC 3LA2AA2YE (10h) + borbulhamento de ar + pulso LA e AA 6h no decorrer do texto.

A **Tabela 13** apresenta os valores experimentais de cada variável analisada a cada hora do cultivo. A **Figura 18** apresenta a curva média dos valores de biomassa (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetato e citrato durante as 15h de cultivo e a **Figura 19** ilustra os dados médios de agitação (rpm) oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real.

O maior crescimento celular nesta condição foi na 8ª hora de cultivo, atingindo 2,63 g/L de massa seca e 6,02 de DO₅₄₀. A maior concentração de OMV, 166,07 mg/L ocorreu na 10ª hora. Esses valores foram os menores obtidos dentre todos os cultivos realizados. A concentração inicial de lactato no meio foi de 12,54 g/L, e este componente foi consumido durante todo cultivo, se esgotando na 10ª hora. Houve uma subida produção de acetato por volta da 5ª hora (3,93 g/L) e 6ª hora (5,42 g/L) de cultivo, seguido por um decaimento na 7ª hora (1,35 g/L) e 8ª hora (1,78 g/L), e novamente um aumento de concentração, atingindo valor máximo de 11,38 g/L na 9ª hora. A concentração de citrato foi oscilante sendo inicialmente em 0,17 g/L, apresentou um pico de 8,37 g/L na 7ª hora, seguido de decaimento para 1,93 g/L na 8ª hora, e novamente um aumento na concentração, atingindo valor máximo de 9,62 g/L na 9ª hora de cultivo. A agitação variou ao longo do cultivo, permanecendo em média em torno dos 450 rpm. Da mesma forma, a concentração de oxigênio dissolvido variou ao longo do cultivo, mas em média, permaneceu em cerca de 30%, tal como

configurado no início do experimento. O pH do meio ajustado inicialmente em 7,0, atingiu 8,9 ao final do cultivo.

Tabela 13 – Resultados médios experimentais das variáveis pH, temperatura (T^oC), oxigênio dissolvido (%), agitação (rpm), densidade óptica (DO₅₄₀), massa seca (g/L), OMV (mg/L) e das concentrações (g/L) de lactato, acetato e citrato. Grupo G: MC 3LA2AA2YE (10h) + borbulhamento de ar + pulso LA e AA 6h.

Tempo	<u>ь</u> Ц	TOC	110 100	O ₂ D	DO	massa	OMV	Lactato	Acetato	Citrato
(h)	рп	PC	rpm	(%)	DO ₅₄₀	seca (g/L)	(mg/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
00	7,5	36	250,0	68,5	0,18	0,08	1,13	12,54	0,04	0,17
01	7,5	36	319,5	23,1	0,39	0,17	2,37	11,94	0,06	0,20
02	7,6	36	386,0	29,0	0,75	0,33	2,73	11,86	0,15	0,10
03	7,7	36	413,0	29,6	1,34	0,59	5,00	10,86	0,25	0,07
04	7,8	36	502,5	29,9	2,75	1,20	14,21	9,35	0,42	0,04
05	7,9	36	530,0	29,6	3,46	1,51	33,36	7,07	3,93	0,12
06	8,1	36	523,5	31,3	4,57	1,99	50,93	1,40	5,42	8,37
07	7,9	36	582,0	30,4	4,65	2,03	75,98	1,40	1,35	1,93
08	8,2	36	594,5	28,2	6,02	2,63	104,02	0,83	1,78	1,98
09	8,5	22	521,0	29,3	5,95	2,60	153,21	0,42	11,38	9,62
10	8,9	36	373,0	33,5	5,96	2,60	166,07	0,00	10,90	8,56

Figura 18 - Curva média dos valores de biomassa em massa seca (g/L), OMV (mg/L) e concentração (g/L) de lactato, acetado e citrato. MC 3LA2AA2YE (10h) aeração por borbulhamento e pulso de lactato e aminoácidos na 6ª hora. As setas representam o momento em os pulsos foram dados.



Figura 19 - Dados médios de agitação (rpm), oxigênio dissolvido (%), temperatura (°C) e pH obtidos em tempo real. MC 3LA2AA2YE (10h) aeração por borbulhamento e pulso de lactato e aminoácidos na 6^a hora. As setas representam o momento em os pulsos foram dados.



4.3. Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos dos cultivos em biorreator foram calculados para cada grupo e são apresentados na **Tabela 14** a seguir:

Tabela 14 – Parâmetros cinéticos dos cultivos em biorreator. $X_{máx}$. – Concentração celular máxima (g/L); $P_{máx}$ – concentração máxima de produto (mg/L); Prod $X_{máx}$ – máxima produtividade celular (gcél/L.h); Prod $P_{máx}$ – máxima produtividade de produto (mgOMV/L.h); $Y_{x/s}$ – fator de conversão substrato em célula (g/g); $Y_{p/s}$ - fator de conversão substrato em produto (mg/g); $Y_{p/x}$ - fator de conversão célula em produto (mg/g); $\mu x_{máx}$ – velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹).

				-					
	Cultivo	X _{máx}	P _{máx}	Prod X _{máx}	Prod P _{máx}	Y _{x/s}	Y _{p/s}	Y _{p/x}	μ X máx
	(tempo)	g/L	mg/L	gcél/L.h	mgOMV/L.h	g/g	mg/g	mg/g	h-1
A	MC 3LA 3AA 3YE (12h)	3,61	325,93	0,36	27,00 (12ªh)	0,49	2,14	4,38	0,83
В	MC 3LA 2AA 2YE (12h)	3,71	340,43	0,33	30,66 (11 ^a h)	0,50	3,29	6,63	0,72
С	MC 3LA 2AA 2YE + pulso AA (12h)	3,39	248,94	0,34	20,70 (11ªh)	0,43	1,02	2,39	0,78
D	MC 3LA 2AA 2YE + pulso LA (12h)	3,22	273,90	0,31	22,54 (12ªh)	0,38	0,18	0,48	0,73
E	MC 3LA 2AA 2YE + pulso LA (15h)	3,49	318,60	0,30	20,80 (15ªh)	0,32	0,06	0,18	0,69
F	MC 3LA 2AA 2YE + pulso LA e AA (15h)	4,28	364,14	0,30	25,92 (14ªh)	-	1,83	1,38	0,78
G	MC 3LA 2AA 2YE borbulhamento de ar + pulso LA e AA (10h)	2,63	166,07	0,32	16,90 (9ªh)	0,30	2,30	7,65	0,69

A maior concentração celular máxima (g/L) foi de 4,28 g/L e a maior concentração máxima de OMV foi de 364,14 mg/L; ambos parâmetros observados no Grupo F - MC 3LA 2AA 2YE (15h) + pulso LA e AA na 8ª hora. A menor concentração celular máxima (g/L) foi de 2,63 g/L e a menor concentração máxima de produto foi de 166,07 mg/L; ambos parâmetros observados no Grupo G - MC 3LA 2AA 2YE (10h) + borbulhamento de ar + pulso LA e AA na 6ª hora.

A maior máxima produtividade celular (gcél/L.h) foi de 0,36 gcél/L.h no Grupo A - MC 3LA 3AA 3YE (12h); e a maior máxima produtividade de produto (mgOMV/L.h) foi de 30,66 mgOMV/L.h, observada no Grupo B - MC 3LA 2AA 2YE (12h). Os maiores valores para os parâmetros cinéticos de conversão de substrato em célula (g/g); substrato em produto (mg/g); e célula em produto (mg/g); foram, respectivamente, 0,50 g/g; 3,29 mg/g; e 6,63 mg/g, observados no Grupo B - MC 3LA 2AA 2YE (12h). A maior velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹) foi de 0,83 h⁻¹ no Grupo A - MC 3LA 3AA 3YE (12h). A média de μ x_{máx} entre todas as condições de cultivo foi de 0,75 h⁻¹ com desvio padrão de 0,05.

4.4. OMV: Eletroforese

Foram feitos géis de SDS-PAGE, 12,5% de acrilamida/bisacrilamida, para todos os cultivos realizados em biorreator (dados não apresentados), a fim de comparar o perfil eletroforético das proteínas presentes nas OMV liberadas por *Neisseria lactamica*.

A **Figura 20** ilustra o padrão proteico das OMV provenientes do cultivo do Grupo A: meio de Catlin com 18,0 g/L de lactato (3LA), com o triplo da concentração original de aminoácidos (3AA), e com 3,0 g/L de extrato de levedura (3LA) por 12h em biorreator.



Figura 20 – SDS-PAGE 12,5% de amostras de OMV em diferentes horas do cultivo em biorreator utilizando meio MC3LA3AA3YE (12h). Grupo A.

Observa-se que a proteína Porina B (PorB), correspondente à banda com aproximadamente 40 kDa, está presente desde as primeiras horas do cultivo, tornando-se mais concentrada ao final do cultivo.

4.5. OMV: Tratamento com detergente

O tratamento com detergente para a remoção do LOS foi realizado a partir das OMV obtidas de culturas de *N. lactamica* em meio MC 3LA2AA2YE por 14h.

A dosagem de LOS foi realizada indiretamente através da dosagem de KDO (2-keto-3-deoxioctanato) das amostras tratadas com diferentes concentrações do detergente deoxicolato de sódio (DOC): 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% em solução de Tris EDTA pH 8,0 (TE). A **Tabela 15** mostra a quantidade de OMV (mg/mL), a recuperação das OMV (%) pós-tratamento, a concentração de KDO (µg/mg de OMV), e a porcentagem de KDO eliminado pelo tratamento. A **Figura 21** e a **Figura 22** ilustram estes valores. A **Figura 23** elucida o padrão de proteína obtido por eletroforese nos diferentes tratamentos.

Tratamento	OMV (mg/mL)	Recuperação (%)	µgKDO/ mgOMV	KDO eliminado (%)
OMV em TE	5,82	100%	79,1	0
OMV em DOC 0,1%	3,55	61%	57,2	21
OMV em DOC 0,2%	4,73	81%	31,5	61
OMV em DOC 0,3%	3,98	68%	18,4	76
OMV em DOC 0,4%	3,17	54%	11,9	85
OMV em DOC 0,5%	3,57	61%	10,6	86

Tabela 15 – OMV (mg/mL) pós-tratamento, recuperação (%), concentração de KDO (µg/mg de OMV), e porcentagem de KDO eliminado em cada tratamento.





Figura 22 - Concentração de KDO (µg/mg de OMV), e porcentagem de KDO eliminado após tratamento com diferentes concentrações de DOC.



Figura 23 – SDS-PAGE 12,5%. Amostras de OMV tratadas com diferentes concentrações de DOC. O perfil eletroforético das proteínas de OMV nos diferentes tratamentos é semelhante, com predominância da proteína Porina B (PorB), correspondente à banda com aproximadamente 40 kDa.



4.6. OMV: Análise Morfológica

Amostras de OMV provenientes da última hora de cultivo e tratadas com o controle em TE (**Figura 24A**) ou 0,5% DOC (**Figura 24B**) foram submetidas à análise em microscopia eletrônica de transmissão com a finalidade de observar sua integridade após o tratamento. As imagens foram obtidas em colaboração com a Dra. Sylvia Mendes Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Amostras de OMV pura (**Figura 25A**), OMV em TE (**Figura 25B**) e OMV em concentração de 0,2% (**Figura 25C**) e 0,3% de DOC (**Figura 25D**) foram, em um segundo momento, submetidas à análise em microscopia eletrônica de transmissão. As imagens foram obtidas em colaboração com a Dra. Aurora Marques Cianciarullo do Laboratório de Genética do Instituto Butantan. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

Em ambos os experimentos foi possível verificar a presença de OMV. Quando utilizado somente TE (controle) elas apresentam-se bem preservadas (**Figura 24A**). Com o tratamento com 0,5% DOC, verifica-se que a integridade das vesículas é comprometida, embora fragmentos de membranas das OMV possam ser observados (**Figura 24B**). Amostras de OMV pura, OMV em TE e OMV em concentração de 0,2% e 0,3% de DOC foram, em um segundo momento, também submetidas à análise em microscopia eletrônica de transmissão. É possível notar que as OMV tratadas com 0,2% e 0,3% DOC, em geral, apresentam morfologia circular, similarmente às OMV em estado puro e em TE (**Figura 25**).

Figura 24 – Microscopia eletrônica de transmissão das OMV tratadas com: (A) OMV em TE. (B) OMV em DOC 0,5%. Técnica de contrastação negativa utilizando molibdato de sódio. As setas com traço contínuo mostram exemplos de OMV inteiras e as setas tracejadas mostram exemplos de OMV rompidas ou em fragmentos de membrana.



Figura 25 – Microscopia eletrônica de transmissão das OMV com diferentes tratamentos: (A) OMV puras. (B) OMV em TE. (C) OMV em DOC 0,2%. (D) OMV em DOC 0,3%. As setas com traço contínuo mostram exemplos de OMV inteiras e as setas tracejadas mostram exemplos de OMV rompidas ou em fragmentos de membrana.



4.7. Ensaios Imunológicos

Com a finalidade de avaliar o efeito adjuvante das OMV de *Neisseria lactamica* quando inoculadas em combinação com PspA5 de *Streptococcus pneumoniae* em camundongos BALB/c, foram realizados dois experimentos independentes com 6 animais por grupo, denominados "Experimento I" e "Experimento II".

A propriedade adjuvante das OMV foi avaliada através da indução de resposta imune contra o antígeno PspA5 após a 1ª e 2ª dose do esquema de vacinação proposto e através de ensaio de sobrevivência após desafio letal com *S. pneumoniae*.

4.7.1. <u>Experimento I:</u> Efeito adjuvante das OMV de *Neisseria lactamica* tratadas com DOC 0,5%

4.7.1.1. Resposta imune contra o antígeno PspA5 após 1ª dose

A **Figura 26** ilustra a concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5 após a primeira dose administrada em animais submetidos a regime vacinal e a **Figura 27** mostra a concentração (ng/mL) de anticorpos de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), séricos específicos para PspA5 após a primeira dose.

A indução de anticorpos avaliada após a primeira dose foi estatisticamente mais alta ($p \le 0,0002$) no grupo que recebeu a proteína PspA5 com OMV como adjuvante (em média 10^4 ng/mL) do que em relação ao grupo que recebeu PspA5 sozinha (em média 10^3 ng/mL). Em relação à detecção das subclasses de IgG, IgG1 e IgG2a, para as formulações PspA5 e PspA5-OMV, ambas apresentaram resposta semelhante, com produção dos dois anticorpos, sendo preferencial a produção de IgG1, indicando resposta imunológica com tendência ao tipo Th2. Figura 26 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 14 dias após a primeira dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. *** $P \le 0,0002$, teste de Mann Whitney.



Figura 27 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 14 dias após a primeira dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo. As barras apresentam as médias das concentrações com os respectivos desvios padrão. O valor acima das barras corresponde ao valor da razão IgG1/IgG2a.



4.7.1.2. Resposta imune contra o antígeno PspA5 após 2ª dose

A **Figura 28** lustra a concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5 após a segunda dose administrada em animais submetidos a regime vacinal e a **Figura 29** mostra a concentração (ng/mL) de anticorpos de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), séricos específicos para PspA5 após a segunda dose.

Após a segunda dose, a indução de anticorpos foi estatisticamente mais alta ($p \le 0,0001$) no grupo que recebeu a proteína PspA5 com OMV como adjuvante (em média 10^5 ng/mL) do que em relação ao grupo que recebeu PspA5 sozinha (em média 10^4 ng/mL), sendo estas concentrações maiores em relação ao observado após a primeira dose. Em relação à detecção das subclasses de IgG para as formulações PspA5 e PspA5-OMV, o perfil de produção de IgG1 e IgG2a apresentou-se semelhante aos dados coletados após a primeira dose, havendo produção dos dois anticorpos e sendo preferencial a produção de IgG1, indicando resposta imunológica com tendência à produção de células do tipo Th2. Após a segunda dose, a maior razão IgG1:IgG2a foi observada no grupo imunizado com PspA5-OMV.

Figura 28 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. *** $P \le 0,0001$, teste de Mann Whitney.



Figura 29 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os respectivos desvios padrão. O valor acima das barras corresponde ao valor da razão IgG1/IgG2a.



4.7.1.3. Sobrevivência após desafio letal com S. pneumoniae

Vinte e um dias após a segunda dose foi realizado o desafio letal com *S. pneumoniae* (ATCC6303) e a sobrevivência de camundongos BALB/c em regime vacinal foi avaliada.

Os resultados obtidos mostram que 75% dos animais imunizados com a formulação PspA5-OMVt0,5% sobreviveram ao desfio (**Figura 30**), sendo esse valor estatisticamente significativo em relação ao observado nos animais não imunizados ($p \le 0,0003$), imunizados com OMV ($p \le 0,0003$) e imunizados somente com a proteína PspA5 ($p \le 0,0391$). PspA5 conferiu proteção a 25% dos animais e essa proteção não se apresentou significativa em relação aos animais não imunizados e nem em relação aos imunizados somente com o adjuvante (p = 0,2174).

Figura 30 – Sobrevivência após desafio letal com *S. pneumoniae* (ATCC6303) em camundongos BALB/c submetidos a regime vacinal. Desafio realizado vinte e um dias após a segunda dose da vacina. Animais observados durante 10 dias. Curva de sobrevivência de sobrevivência de Kaplan-Meyer.


4.7.2. <u>Experimento II:</u> Efeito adjuvante das OMV de *Neisseria lactamica* não tratadas e tratadas com DOC 0,3%

4.7.2.1. Resposta imune contra o antígeno PspA5 após 1ª dose

O esquema de imunização e realização do desafio letal seguiu o mesmo protocolo estabelecido no "Experimento I". Foi realizado um único ensaio com 6 animais por grupo.

A **Figura 31** e a **Figura 32** a seguir ilustram, respectivamente, a concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5; e de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), séricos específicos para PspA5 após a primeira dose do esquema de imunização proposto.

A indução de anticorpos foi estatisticamente mais alta ($p \le 0,0002$) nos grupos que receberam a proteína PspA5 com OMV como adjuvante (em média 10^4 ng/mL) do que em relação ao grupo que recebeu PspA5 sozinha (em média 10^3 ng/mL) e não houve diferença significativa entre as formulações com OMV pura e OMV tratadas. Em relação à detecção das subclasses de IgG, IgG1 e IgG2a, todas as três formulações vacinais (PspA5, PspA5-OMVp e PspA5-OMVt0,3%) apresentaram resposta semelhante, com produção dos dois anticorpos e sendo preferencial a produção de IgG1, indicando resposta imunológica com tendência ao tipo Th2. Figura 31 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 14 dias após a primeira dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. *** $P \le 0,0002$, teste de Mann Whitney.



Figura 32 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 14 dias após a primeira dose da vacina O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os respectivos desvios padrão. O valor acima das barras corresponde ao valor da razão IgG1/IgG2a.



4.7.2.2. Resposta imune contra o antígeno PspA5 após 2ª dose

A **Figura 33** e a **Figura 34** a seguir ilustram, respectivamente, a concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5, e de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), séricos específicos para PspA5 após a segunda dose do esquema de imunização proposto.

Após a segunda dose, a indução de anticorpos foi estatisticamente mais alta ($p \le 0,0043$) nos grupos que receberam a proteína PspA5 com OMV como adjuvante (em média 10⁵ng/mL) do que em relação ao grupo que recebeu PspA5 sozinha (em média 10⁴ng/mL), sendo estas concentrações maiores em relação ao observado após a primeira dose. Não houve diferença significativa entre os grupos vacinais que utilizaram OMV pura e OMV tratada. Em relação à detecção das subclasses de IgG para as formulações PspA5 e PspA5-OMV, o perfil de produção de IgG1 e IgG2a apresentou-se semelhante aos dados coletados após a primeira dose, havendo produção dos dois anticorpos e sendo preferencial a produção de IgG1, indicando resposta imunológica com tendência ao tipo Th2.

Figura 33 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. ** $P \le 0,0043$, teste de Mann Whitney.



Figura 34 – Concentração (ng/mL) de subclasses de IgG. IgG1 e IgG2a, séricos específicos para PspA5 em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os respectivos desvios padrão. O valor acima das barras corresponde ao valor da razão IgG1/IgG2a.



4.7.2.3. Sobrevivência após desafio letal com S. pneumoniae

Vinte e um dias após a segunda dose foi realizado o desafio letal com *S. pneumoniae* (ATCC6303) e a sobrevivência de camundongos BALB/c em regime vacinal foi avaliada.

Em relação aos grupos controle (salina, OMVpura e OMVtrat.), somente no grupo OMVpura, 16,7% dos animais sobreviveram. No que diz respeito ao grupo vacinal sem adjuvante (PspA5), 50% dos animais sobreviveram ao desafio. Os grupos vacinais com adjuvante, apresentaram sobrevivência de 100% e 66,7%, respectivamente, PspA5-OMVp e PspA5-OMVt0,3% (**Figura 35**).

Figura 35 – Sobrevivência após desafio letal com *S. pneumoniae* (ATCC6303) em camundongos BALB/c submetidos a regime vacinal. Desafio realizado vinte e um dias após a segunda dose da vacina. Animais observados durante 10 dias. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meyer.



4.7.3. Ensaios Imunológicos: Resposta imune contra o antígeno OMV

A **Figura 36** e a **Figura 37** a seguir ilustra a concentração de IgG anti-OMV de *N. meningitidis* B induzidos após a segunda dose da formulação, respectivamente no Experimento I e Experimento II.

No Experimento I é possível observar que ambas as formulações OMV_{t0,5%} e PspA5-OMV_{t0,5%} foram capazes de induzir anticorpos anti-OMV de *N. meningitidis* (~10³ ng/mL). Contudo, esta indução de anticorpos anti-OMV de *N. meningitidis* foi significativamente menor em relação à indução de anticorpos anti-OMV de *N. lactamica*, gerados pelos grupos controle positivos: OMV_{t0,5%} e PspA5-OMV_{t0,5%} contra OMV de *N. lactamica*) ($p \le 0,0001$), e a presença da proteína PspA na formulação não influenciou na maior ou menor produção de anticorpos.

No Experimento II, igualmente em relação ao Experimento I, é possível observar que a formulação PspA5 com OMV de *N. lactamica* tratada com DOC 0,3% também foi capaz de induzir anticorpos anti-OMV de *N. meningitidis* B, embora em menor concentração (~10² ng/mL).

Figura 36 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos reativos para OMV de *N. meningitidis* B em animais submetidos a regime vacinal do "Experimento I". A indução de IgG séricos específicos para OMV de *N. lactamica* foi utilizada como controle. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. *** $P \leq 0,0001$, teste de Mann Whitney.



Figura 37 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos reativos para OMV de *N. meningitidis* B em animais submetidos a regime vacinal do "Experimento II". A indução de IgG séricos específicos para OMV de *N. lactamica* foi utilizada como controle. Detecção por ELISA. O soro foi coletado 20 dias após a segunda dose da vacina. O gráfico ilustra o resultado de 1 experimento com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. ** *P*≤0,0022, teste de Mann Whitney.



4.7.4. Ligação de anticorpos anti-PspA5 ao pneumococo

Com a finalidade de avaliar a capacidade de ligação de anticorpos anti-PspA5 à superfície da bactéria *S. pneumoniae* ATCC6303, foi realizado um ensaio *in vitro* com o pool de soros de cada grupo obtidos após a primeira dose do "Experimento I". O anticorpo secundário anti-IgG conjugado a FITC foi incubado e em seguida, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo. As curvas de detecção da ligação de IgG anti-PspA5 à superfície de *S. pneumoniae* (ATCC6303) estão representadas na **Figura 38**.

Os resultados mostram que os soros de animais imunizados com PspA5-OMV apresentaram maior capacidade de ligação à superfície do pneumococo (mediana de 498) em relação aos demais grupos. Não houve diferença entre o soro dos grupos controles (mediana 79,9), OMV (mediana 79,3) e do grupo vacinal composto somente pela proteína PspA5 (mediana 98,8) (**Figura 38**).

Figura 38 – Ligação de anticorpos anti-PspA5 à superfície de *S. pneumoniae*. Ensaio realizado *in vitro*. A bactéria foi incubada com 5% do soro dos animais reunidos em pool por grupo. Os valores de mediana evidenciados representam a intensidade da fluorescência para os diferentes grupos.



5. DISCUSSÃO

5.1. Cultivo e Metabolismo de N. lactamica

Atualmente, no banco de dados on-line da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto (KEGG) existem 20 genomas de *Neisseria* sequenciados, sendo somente um genoma completo de *N. lactamica* (isolate 020-06).

A **Tabela 16** e a **Figura 39** foram desenhadas a partir de dados obtidos da plataforma online KEGG (2017). O esquema ilustra o metabolismo de *N. lactamica* e as vias pelas quais este microrganismo obtém os precursores para a formação de compostos necessários à biossíntese dos constituintes celulares. A interpretação do fluxo metabólico de *N. lactamica* será utilizada para a discussão e comparação dos resultados obtidos nos cultivos deste projeto.

PrecursorMoléculas sintetizadasGlicose 6-fosfatoLipopolissacarídeo e glicogênioFrutose 6-fosfatoLipopolissacarídeo e peptidioglicano (aminoaçúcares)Ribose 5-fosfatoÁcidos nucléicos, histidinaEritrose 6-fosfatoFenilalanina, triptofano, tirosinaSedoheptulose 7-fosfatoLipopolissacarídeoGliceraldeído 3-fosfatoLipódeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos		
Glicose 6-fosfatoLipopolissacarídeo e glicogênioFrutose 6-fosfatoLipopolissacarídeo e peptidioglicano (aminoaçúcares)Ribose 5-fosfatoÁcidos nucléicos, histidinaEritrose 6-fosfatoFenilalanina, triptofano, tirosinaSedoheptulose 7-fosfatoLipopolissacarídeoGliceraldeído 3-fosfatoLipódeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoSuccinil-CoASuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Precursor	Moléculas sintetizadas
Frutose 6-fosfatoLipopolissacarídeo e peptidioglicano (aminoaçúcares)Ribose 5-fosfatoÁcidos nucléicos, histidinaEritrose 6-fosfatoFenilalanina, triptofano, tirosinaSedoheptulose 7-fosfatoLipopolissacarídeoGliceraldeído 3-fosfatoLipídeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoSuccinil-CoASuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Glicose 6-fosfato	Lipopolissacarídeo e glicogênio
Ribose 5-fosfatoÁcidos nucléicos, histidinaEritrose 6-fosfatoFenilalanina, triptofano, tirosinaSedoheptulose 7-fosfatoLipopolissacarídeoGliceraldeído 3-fosfatoLipídeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Frutose 6-fosfato	Lipopolissacarídeo e peptidioglicano (aminoaçúcares)
Eritrose 6-fosfatoFenilalanina, triptofano, tirosinaSedoheptulose 7-fosfatoLipopolissacarídeoGliceraldeído 3-fosfatoLipídeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Ribose 5-fosfato	Ácidos nucléicos, histidina
Sedoheptulose 7-fosfatoLipopolissacarídeoGliceraldeído 3-fosfatoLipídeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Eritrose 6-fosfato	Fenilalanina, triptofano, tirosina
Gliceraldeído 3-fosfatoLipídeos (glicerol 3-fosfato)3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Sedoheptulose 7-fosfato	Lipopolissacarídeo
3-fosfogliceratoGlicina, cisteína e serinaFosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Gliceraldeído 3-fosfato	Lipídeos (glicerol 3-fosfato)
FosfoenolpiruvatoFenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicanoPiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	3-fosfoglicerato	Glicina, cisteína e serina
PiruvatoAlanina, valina, isoleucina, lisinaAcetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Fosfoenolpiruvato	Fenilalanina, triptofano, tirosina, peptidioglicano
Acetil-CoALeucina, lipídeos (ácidos graxos)α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Piruvato	Alanina, valina, isoleucina, lisina
α-cetoglutaratoArginina, glutamato, glutamina, prolinaOxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Acetil-CoA	Leucina, lipídeos (ácidos graxos)
OxalacetatoAspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e treoninaSuccinil-CoAAnéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	α-cetoglutarato	Arginina, glutamato, glutamina, prolina
Succinil-CoA Anéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos	Oxalacetato	Aspartato, asparagina, isoleucina, lisina, metionina e
Succinil-CoA Anéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos		treonina
	Succinil-CoA	Anéis pirrólicos dos grupos heme dos citocromos

Tabela 16 - Treze compostos intermediários precursores.

Fonte: KEGG (2017).



Figura 39 – Modelo esquemático do metabolismo de Neisseria lactamica.



Observando o esquema do metabolismo de *N. lactamica* na **Figura 39**, e as moléculas sintetizadas a partir dos precursores, constata-se que o ciclo do ácido tricarboxílico, TCA, é requerido para a síntese de precursores metabólicos, aminoácidos em sua maioria; enquanto que as demais vias catalisam a glicose e metabolizam outras fontes de carbono, como o lactato, gerando compostos intermediários para a biossíntese de constituintes celulares, inclusive OMV.

As OMV, originadas a partir da evaginação da membrana externa de *N. lactamica*, são o produto de interesse deste projeto e, embora seja a partir da glicose que compostos intermediários para a biossíntese de constituintes celulares e, consequentemente, das OMV sejam sintetizados, a grande maioria dos trabalhos que visam à obtenção de maior produtividade de OMV por *N. meningitidis e N. lactamica*, utilizam o lactato como principal fonte de carbono (Santos *et al.* 2011; Gonçalves, 2012; Salustiano, 2015). Essa escolha pelo lactato pode estar associada ao fato desses microrganismos não possuírem o gene que codifica a enzima fosfogliceratomutase, que promove a conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato. Dessa forma, a via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou via glicolítica, contribui somente em parte para a degradação da glicose, e, portanto, a presença do lactato diretamente no meio possibilita a produção de piruvato independentemente da via glicolítica.

A maioria dos estudos presentes na literatura envolvendo metabolismo de carbono em *Neisseria* associa o consumo da glicose com a produção de polissacarídeo, principal produto do cultivo de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C (Baruque-Ramos *et al.*, 2006; Santos, 2007). Nesse caso, *N. lactamica* cataboliza glicose em piruvato principalmente através da via de Entner Douderoff e, em menor extensão, por meio da via das pentoses. Fu *et al.* (1995) demonstrou que a glicose como principal fonte de carbono pode propiciar uma maior produtividade celular quando comparada ao uso do lactato em cultivos de *N. meningitidis* B11. No entanto, tais cultivos foram realizados com o objetivo de otimizar a geração de biomassa e não foi avaliada a produção de OMV.

Como ilustrado na **Figura 39**, o lactato é convertido a piruvato (seta rosa) e seus precursores entram do ciclo do ácido tricarboxílico, sintetizando principalmente

os aminoácidos (vide **Tabela 16**). A única espécie de *N. lactamica* com genoma sequenciado (*isolate* 020-06) no KEGG (2017) possui 3 tipos de lactatodesidrogenase (LDH) responsáveis pela captação e incorporação do lactato através da transformação do lactato em piruvato: (1) L-lactato desidrogenase, atuando como uma enzima oxidorredutase com um citocromo como aceptor de elétron; (2) D-lactato desidrogenase, atuando como uma enzima oxidorredutase com um a enzima oxidorredutase com um citocromo como aceptor de elétron; (2) D-lactato desidrogenase, atuando como uma enzima oxidorredutase com um Quinona ou componente similar como aceptor de elétron. Ambas *N. lactamica* e *N. meningitidis* possuem o ciclo do ácido tricarboxílico completo, sendo que a oxidação do malato a oxalacetato é promovida pela enzima malato-desidrogenase ligada à membrana (Leighton *et al.*, 2001; Kegg, 2017).

Gonçalves (2012), cultivando *N. lactamica* em agitador rotativo verificou através de experimentos fatoriais que o lactato de sódio é a principal fonte de carbono nos meios utilizados por ela para a produção de OMV. Gonçalves (2012) verificou uma correlação positiva entre a concentração inicial de lactato no meio de cultura e uma maior produtividade das OMV.

Dada a importância do lactato ao cultivo de *N. lactamica* e para a produção das OMV, antes de iniciar os ensaios em biorreatores, optou-se por realizar um cultivo em agitador rotativo com o objetivo de verificar o efeito de diferentes concentrações do lactato de sódio no meio de Catlin, MC, no crescimento de *N. lactamica* e no rendimento das OMV. Analisando-se a biomassa, por OD₅₄₀, em cultivo em agitador rotativo, não foi observada diferença entre as condições de cultivo (**Tabela 6** e **Figura 4**). Em todas as condições, a maior biomassa foi observada entre a 10^a e 11^a hora de cultivo, e foram semelhantes, em média 2,89, variando de 2,68 a 3,11 sendo que este maior valor foi na condição onde o meio de Catlin teve a concentração de lactato triplicada, a de aminoácidos duplicada e 2,0 g/L de extrato de levedura (MC3LA2AA2YE). Neste meio MC nestas concentrações de lactato, aminoácido e extrato de levedura, a concentração de OMV foi a maior obtida, 79,2 mg/L, sugerindo ser esta a melhor condição dentre as testadas (**Figura 5**). A diminuição da concentração de OMV nos meios 4, 5 e 6, onde a concentração de lactato é maior em relação ao meio 4, indica uma possível inibição pelo substrato lactato.

Esse ensaio foi essencial para avaliar o efeito da concentração de lactato, principal fonte de carbono, para *N. lactamica.* Os resultados obtidos contribuíram para o planejamento dos experimentos em biorreatores, nos quais foi considerado como ponto de partida para todos os cultivos três vezes a concentração de lactato presente no meio de Catlin (18,0 g/L), duas vezes a concentração dos aminoácidos do meio de Catlin, e 2,0 g/L de extrato de levedura. Em alguns cultivos em biorreator (Grupos C, D, E, F e G) foram administrados pulsos de lactato de 6,0 g/L e/ou aminoácidos (concentração original do MC) na 6^a ou 8^a hora de cultivo. Com a exceção do cultivo do Grupo D, que apresentou concentração de lactato de 3,80 g/L ao final do cultivo, todos os demais tiveram lactato totalmente consumido ou com concentração final de até 0,4 g/L até a última hora de cultivo (**Figura 6, Figura 8, Figura 10, Figura 12, Figura 14, Figura 16 e Figura 18**).

Em relação às outras fontes de carbono analisadas neste projeto: acetato e citrato. *N. lactamica* converte acetato em acetil-P pela enzima acetato quinase, e acetil-P é convertido a acetil-CoA pela enzima fosfato-acetiltransferase (setas em verde na **Figura 39**). O citrato é produzido a partir do acetil-CoA pela enzima citrato sintase, e este é convertido a isocitrato pela enzima aconitato hidratase.

Em todos os experimentos deste estudo houve a produção de acetato ao longo do cultivo. As concentrações máximas observadas em cada grupo de experimentos foram as seguintes: Grupo A, 5,55 g/L (11^ah); Grupo B, 5,67 g/L (10^ah); Grupo C, 5,73 g/L (11^ah); Grupo D, 6,13 g/L (12^ah); Grupo E, 7,36 g/L (14^ah); Grupo F, 7,65 g/L (15^ah); e Grupo G, 11,38 g/L (9^ah). Nos grupos A, B, C, E e F, observa-se que o consumo do acetato produzido se inicia no instante em que o lactato se torna limitante no meio de cultura. Essa alteração de via metabólica pode ser observada na curva de biomassa, quando um ponto de inflexão pode ser notado no instante que antecede o início do consumo do acetato que foi produzido (**Figura 6, Figura 8, Figura 10, Figura 14 e Figura 16**). No Grupo D, o consumo de acetato não foi observado (**Figura 12**), pois o lactato não foi totalmente consumido até o final do experimento, uma vez que foi dado um pulso de lactato na 8^a hora. No Grupo G, houve produção de acetato até a 6^a hora de cultivo, quando a concentração chegou a 5,42 g/L, seguido por um consumo nas duas horas subsequentes, que coincide com a limitação do lactato, e

novamente uma produção nas duas horas finais do cultivo, cuja concentração de acetato chegou a 10,90 g/L (Figura 18).

O citrato, por sua vez, nos cultivos dos grupos de A a F, apresenta baixa variação de amplitude. Em geral observa-se uma diminuição da concentração nas horas iniciais de cultivo e, por volta da 7^a hora, verifica-se um pequeno aumento que se aproxima às concentrações inicias do meio (~0,40 g/L). No Grupo G, houve produção e consumo de citrato. Especificamente neste grupo, foi observado que paralelamente ao esgotamento do lactato e consumo de acetato, também houve o consumo do citrato produzido.

Gonçalves (2012), em seu estudo sobre a cinética de cultivos descontínuo alimentado de *N. lactamica*, quando utilizou o meio de Catlin com o dobro das concentrações de lactato, de aminoácidos, com 2,0 g/L de extrato de levedura, alimentação com lactato e/ou pulsos de aminoácidos e adição de extrato de levedura, observou o consumo do acetato e citrato produzidos durante o cultivo, sendo que o citrato era sempre consumido antes do acetato. Além disso, o consumo de acetato e citrato o correram mesmo quando ainda havia lactato no meio, diferentemente do observado nos cultivos deste projeto. Essa diferença na dinâmica de consumo das fontes de carbono entre os cultivos de Gonçalves (2012) e os cultivos deste projeto pode estar relacionada à diferença no balanço de fontes de carbono e nitrogênio. Conforme demonstrado no experimento em agitador rotativo, o balanço das concentrações 3LA:2AA:2YE, apresentou melhor resultado tanto em relação ao crescimento bacteriano quanto em relação à produção de OMV, quando comparado ao balanço 2LA:2AA:2YE, adotado por Gonçalves (2012) na maioria de seus cultivos utilizando esta mesma cepa de *N. lactamica*.

Santos (2011), cultivando *N. meningitidis* em biorreator em meio de Catlin, realizou a dosagem de glicerol no meio por HPLC durante todo cultivo e observou que este componente não é consumido por esta espécie. Da mesma forma, Gonçalves (2012), cultivando a mesma cepa de *N. lactamica* utilizada neste trabalho em meio de Catlin, também observou que o glicerol presente no meio não havia sido consumido durante o cultivo. Os dados do KEGG mostram que *N. lactamica* não possui o gene

que codifica a enzima fosfoglicerato-mutase, que promoveria a conversão de 3fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato a partir do glicerol. Dessa forma, o glicerol, presente no meio de Catlin na concentração de 5,0 g/L, por não ser fonte de carbono para *N. lactamica,* não foi mensurado durante os cultivos deste projeto. Santos (2011) e Gonçalves (2012) sugerem que este componente tenha importância na preservação e integridade das OMV e potencialmente poderia atuar como um protetor mecânico para as vesículas de membrana externa.

Em relação aos aminoácidos sintetizados por *N. lactamica*, com exceção do aminoácido asparagina, todos os demais possuem genes responsáveis pela tradução de enzimas capazes de converter os precursores destes aminoácidos e sintetizá-los. A **Figura 40**, a seguir, ilustra a biossíntese de aminoácidos por *N. lactamica*. As setas verdes indicam a presença de genes capazes de produzirem enzimas que convertem a reação. Setas pretas indicam genes que não foram identificados ou que são inexistentes neste microrganismo. A análise da concentração de aminoácidos seria de grande valia para melhor compreensão do metabolismo de *N. lactamica* e contribuiria para estudos futuros do rendimento de OMV.

Figura 40 – Biossíntese de Aminoácidos em *Neisseria lactamica*. Com exceção do aminoácido asparagina (em destaque), todos os demais possuem genes responsáveis pela tradução de enzimas capazes de converter os precursores destes aminoácidos e sintetizá-los.



Fonte: KEGG (2017).

Em relação ao extrato de levedura (YE), Gonçalves (2012) realizou ensaios com *N. lactamica* retirando os aminoácidos do meio de Catlin (1973) e substituindo-os por extrato de levedura, e retirando o extrato de levedura e substituindo-o pela concentração de seus 20 aminoácidos em um meio com composição definida. Neste experimento realizado com a mesma cepa de *N. lactamica* deste trabalho, a autora concluiu que no extrato de levedura deve haver algum fator de crescimento para *N. lactamica*, pois quando o YE foi substituído pela composição de um meio definido, o crescimento e o rendimento das OMV não foram maiores do que quando utilizado o componente complexo. Dessa forma, para este projeto, optou-se por incluir o extrato de levedura ultrafiltrado em todas as composições de meio de cultura.

Os parâmetros cinéticos avaliados em todos os cultivos: concentração de massa seca; produtividade celular; velocidade máxima de crescimento celular; concentração de OMV; produtividade de OMV e fatores de conversão foram apresentados na **Tabela 14**.

Nos gráficos de concentração celular (**Apêndice 5**), observa-se que o perfil de crescimento em todas as condições foi semelhante, havendo inicialmente uma fase exponencial nas três primeiras horas de cultivo, seguido por uma fase de crescimento linear nas 3-4 horas subsequentes, e uma fase de desaceleração e estacionária. Entre as fases de desaceleração e estacionária é possível observar em todos os cultivos pelo menos um ponto de inflexão da curva de crescimento. Este ponto representa uma possível alteração da via metabólica devido à limitação da fonte de carbono principal, neste caso o lactato, e passando a consumir como alternativa à limitação, fontes de carbono secundárias provenientes do metabolismo bacteriano, como o acetato e citrato.

O Grupo F apresentou o maior valor de massa seca, 4,28 g/L, enquanto o Grupo G apresentou o menor valor de massa seca, 2,63 g/L, quando comparado aos demais grupos. No Grupo F e no Grupo G as condições iniciais do meio de cultura foram as mesmas (3LA2AA2YE), porém o tempo total de cultivo foi de 15h no Grupo F e de 10h no Grupo G. O pulso de lactato e aminoácidos foi administrado na 8ªh no Grupo F e na 6ªh no Grupo G. No Grupo G foi efetuada aeração por borbulhamento

de ar por baixo e é possível que esta condição tenha favorecido o cisalhamento das células bacterianas, diminuindo a concentração celular.

Em relação aos valores de produtividade, de modo geral, os resultados de máxima produtividade de células apresentaram pouca variação entre os experimentos realizados, com média de 0,32 g cél/L.h e desvio padrão de 0,02. O maior valor de máxima produtividade celular (g cél/L.h) foi observado no Grupo A, de 0,36 g cél/L.h.

A maior velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu x_{máx}$) foi de 0,83 h⁻¹, também observada na condição do Grupo A. Como a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu x_{máx}$) é calculada no intervalo de tempo em que o crescimento é exponencial e, portanto, quando a velocidade de crescimento é constante (da hora zero à 3^a hora – **Apêndice 5**), com exceção dos cultivos do Grupo A e do Grupo G, que apresentavam diferentes condições de disponibilidade de nutrientes e oxigênio dissolvido, esperava-se que a velocidade específica fosse semelhante entre as demais condições. A média de $\mu x_{máx}$ entre todas as condições de cultivo foi de 0,75 h⁻¹ com desvio padrão de 0,05.

Estes resultados observados no Grupo A podem estar relacionados às observações de Gonçalves (2012) e Salustiano (2015) em experimentos com *N. lactamica*: enquanto o lactato tem papel importante relacionado à produção de OMV, os aminoácidos e o extrato de levedura parecem estar mais relacionados ao crescimento celular. O Grupo A, em relação aos demais grupos, foi a única condição que se iniciou com meio com maior disponibilidade de aminoácidos e extrato de levedura, em proporção 3LA:3AA:3YE. Todas as demais condições de cultivo, seguiram a proporção inicial de 3LA:2AA:2LA.

Em relação à OMV, em todas as condições, as vesículas foram produzidas desde o início do cultivo. Contudo, é a partir da 6^a e 7^a hora que se observa um aumento na velocidade de liberação das OMV. Esse período coincide com o final da fase exponencial de crescimento de *N. lactamica* que, em geral, foi até a 3^a e 4^a hora de cultivo. Na hora de cultivo em que a velocidade de produção de OMV ultrapassa a velocidade de crescimento bacteriano, a concentração de lactato está em torno de 8,5

- 9,0 g/L, ou seja, quando praticamente 50% do lactato foi consumido. Assim como observado em cultivos de *N. meningitidis* B (Santos, 2012; e Salustiano, 2015) e de *N. lactamica* (Gonçalves, 2012; e Salustiano, 2015), a formação do produto é não-associada ao crescimento, como pode ser observado na **Figura 41** a seguir, ilustrativa do crescimento bacteriano ln (X/X₀) e formação de produto (OMV) ln (P/P₀) em função do tempo.

Assim como observado para a concentração celular, os Grupos F e G apresentaram, respectivamente, o maior e o menor valor de concentração de OMV: 364 mg/L e 166 mg/L. Ambos cultivos iniciaram com mesma concentração de componentes do meio de cultura, com a concentração de lactato triplicada (18,0 g/L) e a concentração de aminoácidos duplicada em relação às concentrações originais do meio de Catlin sem ferro, e o acréscimo de 2,0 g/L de extrato de levedura. Nas duas condições também houve a adição de pulso de lactato e de aminoácidos, apesar de terem sidos em momentos diferentes, de acordo com a cinética observada no momento do cultivo. A diferença principal foi no Grupo G, em que houve o borbulhamento de ar diretamente no meio de cultivo. O borbulhamento pode ter diminuído a concentração celular, seja pela excessiva produção de espuma que promoveu a perda de células na parede do biorreator, e/ou por um possível cisalhamento e lise devido à forte agitação e/ou pelo uso de antiespumante. Tais fatores parecem também ter limitado a produção de OMV. A segunda condição com maior produção de OMV (mg/L) foi do Grupo B, no qual os cultivos foram realizados por 12h utilizando meio de cultura com o triplo da concentração de lactato (18,0 g/L) e o dobro da concentração de aminoácidos em relação às concentrações originais do meio de Catlin sem ferro, e o acréscimo de 2,0 g/L de extrato de levedura. Neste grupo, a concentração máxima de OMV atingiu 340 mg/L.

Figura 41 – Logaritmo neperiano da concentração celular (massa seca) ℓn (X/X₀) (em azul) e formação de produto (OMV) ℓn (P/P₀) (em vermelho) em função do tempo. A. MC 3LA3AA3YE. B. MC 3LA2AA2YE. C. MC 3LA2AA2YE com pulso de aminoácidos na 8ª hora. D. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora e F. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora e F. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora e F. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. MC – meio de Catlin sem ferro. LA – lactato. YE – extrato de levedura ultrafiltrado. O número 2 ou 3 à frente de cada sigla corresponde a quantas vezes o componente teve sua concentração dobrada (2) ou triplicada (3) em relação ao meio original de Catlin.



Em relação à produtividade máxima de OMV (mg OMV/L.h), o Grupo B apresentou maior valor (30,66 mg OMV/L.h na 11^a hora de cultivo); seguido pelo Grupo F (25,92 mg OMV/L.h na 14^a hora de cultivo). Ambas as condições apresentaram valores máximos na penúltima hora de cultivo e tal fato pode relacionar a limitação de nutrientes disponíveis no meio a uma maior – e mais rápida – liberação de OMV. Em contrapartida, o menor valor de produtividade máxima de OMV foi observado no Grupo G (16,90 mg OMV/L.h na 9^a hora de cultivo).

Sobre a velocidade de formação das OMV, o Grupo G apresentou maior velocidade de formação de produto, de modo que na 5^a hora de cultivo, a velocidade de formação de OMV já havia superado a velocidade de formação de células (**Figura 41**). Muito provavelmente o processo de formação do produto foi acelerado pelo estresse fisiológico sofrido por *N. lactamica* nas condições do cultivo.

Quanto ao fator de conversão de lactato em células ($Y_{x/s}$), o maior valor foi observado no Grupo B (0,50 g cél/g lactato). Nesta condição, os cultivos foram realizados por 12h utilizando meio de cultura com o triplo da concentração de lactato (18,0 g/L) e o dobro da concentração de aminoácidos em relação às concentrações originais do meio de Catlin sem ferro, e o acréscimo de 2,0 g/L de extrato de levedura. O fator de conversão Y_{x/s} apresentou média entre os ensaios de 0,40 g cél/g lactato e desvio padrão de 0,08. O grupo B também apresentou maior valor no fator de conversão de lactato em produto (Y_{p/s}): 3,29 mg OMV/g lactato. Os resultados calculados para este parâmetro apresentaram alto desvio entre eles, e uma possível explicação é uma maior probabilidade de erro e variação quando se realiza a dosagem de proteína por método colorimétrico nas horas iniciais do cultivo, quando as concentrações de proteínas são ainda muito baixas para uma detecção assertiva. Esta mesma variação também aconteceu no cálculo do fator de conversão de células em OMV (Y_{p/x}). O maior valor observado neste parâmetro foi de 7,65 mg OMV/g cél no Grupo G (MC3LA2AA2YE borbulhamento de ar + pulso LA e AA 10h).

Os ensaios dos Grupos C (meio MC 3LA2AA2YE + pulso AA) e D (meio MC 3LA2AA2YE + pulso LA) foram realizados em paralelo, e seus resultados foram interessantes para comparar o efeito da adição de uma fonte de carbono (lactato) e

de uma fonte de nitrogênio (aminoácidos). Comparando esses dois grupos, a maior concentração de células no meio MC 3LA2AA2YE (pulso AA) foi na 11ª hora de cultivo, atingindo 3,39 g/L e a maior concentração de OMV, 248,94 mg/L, na 12ª hora. Já no meio MC 3LA2AA2YE (pulso LA), a maior biomassa foi de 3,22 g/L na 12ª hora de cultivo e a maior concentração de OMV foi de 273,90 mg/L também na 12ª hora. Apesar da diferença dos valores de concentração de células e de OMV entre os dois experimentos não ser expressiva, somente analisando esses dois parâmetros é possível estabelecer a mesma relação direta entre uma maior concentração de aminoácidos no meio e um maior crescimento bacteriano, e entre uma maior concentração de lactato no meio e um maior rendimento de OMV, tal como também observada por Gonçalves (2012). Além disso, verifica-se que logo após o pulso de aminoácidos houve um aumento significativo da biomassa, que passou de 2,10 g/L para 3,11 g/L entre a 8ª e a 9ª hora. Tal fenômeno não ocorreu na condição em que o lactato foi adicionado como pulso, contudo, essa condição conseguiu atingir maior concentração final de OMV em relação ao cultivo com pulso de aminoácidos, e até o final do cultivo a concentração de OMV não desacelerou.

De modo geral, observa-se que nos cultivos realizados, o ponto máximo de liberação das OMV coincide com o esgotamento da principal fonte de carbono, o lactato, e esse instante pode ser evidenciado durante o cultivo através do aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

O parâmetro oxigênio dissolvido (O₂D) foi primeiro analisado em cultivos de *N. lactamica* por Gonçalves (2012). A autora estudou a influência da concentração de 10% e 30% de oxigênio dissolvido no meio em relação ao perfil de crescimento deste microrganismo e à taxa de produção das OMV. A conclusão deste trabalho foi que não houve diferença no crescimento bacteriano e na produção de OMV utilizando-se 10% ou 30% de O₂D. Dessa forma, o grupo optou pelo estabelecimento de agitação livre entre 250 e 850 rpm para manter o oxigênio dissolvido (O₂D) em 30% de modo a evitar a limitação deste componente no meio.

Este projeto apresenta resultados inéditos sobre a influência do oxigênio dissolvido no meio para o cultivo de *N. lactamica* e para a obtenção de um maior

rendimento de vesículas de membrana externa. Com o objetivo de auxiliar a discussão desse importante parâmetro do cultivo, os gráficos da **Figura 42** a seguir foram desenhados de modo a ilustrar os valores da concentração de lactato (mg/L) e oxigênio dissolvido (O₂D), ressaltando o valor da concentração máxima de OMV obtido na hora de cultivo correspondente.

Em todos os grupos com exceção do Grupo G, que foi realizado com borbulhamento de ar diretamente no meio, observa-se que nas duas primeiras horas de cultivo, o oxigênio dissolvido no meio atinge valores próximos aos 30% preestabelecidos e a agitação neste período não opera em velocidade máxima de 850 rpm. Após esse período, verifica-se que a agitação começa a operar em velocidade máxima, no entanto, tal agitação não é suficiente para manter O₂D em 30%, observando um decaimento considerável de O₂D para menos de 1,5% (grupos A, B, C, E e F), que se mantém até aproximadamente a penúltima ou antepenúltima hora de cultivo, quando se observa um aumento para aproximadamente 30%.

Nos cultivos dos grupos A, B e C, realizados por 12 horas, verifica-se que por volta das 2 horas finais do cultivo a porcentagem de O₂D retorna à concentração de aproximadamente 30% e a agitação passa a operar em valores menores ao máximo estabelecido. Coincidentemente, observa-se que no intervalo em que a O₂D retorna a aproximadamente 30% e a agitação decai, a concentração de lactato é menor do que 0,5 g/L. Neste período também é observada as maiores concentrações de célula (g/L) e OMV (mg/L) (**Tabela 7, Figura 6 e Figura 7; Tabela 8, Figura 8 e Figura 9; Tabela 9, Figura 10, e Figura 11**).

No ensaio do grupo D (MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8^ah e cultivo realizado por 12h), verifica-se que a O₂D não retorna à concentração de 30% preestabelecida e a agitação opera em rotação máxima de 850 rpm até o final do cultivo. A concentração de lactato, por sua vez, não se esgotou, e ao final do cultivo ainda haviam 3,80 g/L de lactato disponível no meio **(Tabela 10, Figura 12 e Figura 13)**.

Figura 42 – Concentração de lactato (mg/L) e oxigênio dissolvido (%). Grupo A. MC 3LA3AA3YE. Grupo B. MC 3LA2AA2YE. Grupo C. MC 3LA2AA2YE com pulso de aminoácidos na 8ª hora. Grupo D. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. Grupo E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. Grupo E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. Grupo G. MC 3LA2AA2YE com borbulhamento de ar e pulso de lactato e aminoácidos na 6ª hora. MC – meio de Catlin sem ferro. LA – lactato. YE – extrato de levedura ultrafiltrado.



A partir destas constatações, a porcentagem de oxigênio dissolvido no meio ganhou atenção no planejamento de cultivos subsequentes (grupos E e F), por ser um parâmetro que potencialmente poderia ser utilizado para indicar, em tempo real durante o cultivo, o momento em que a limitação do lactato ocorre. Com a limitação da principal fonte de carbono, espera-se que haja um estresse bacteriano ao meio, estimulando o aumento da vesiculação e maior rendimento final de OMV.

Os ensaios do Grupo E (MC 3LA2AA2YE pulso LA 8^ah) e do Grupo F (MC 3LA2AA2YE pulso LA e AA 8^ah) foram planejados de modo que a duração dos cultivos fosse de uma hora após o aumento da taxa de oxigênio dissolvido e diminuição da agitação no meio. Em ambos os grupos, esse momento aconteceu na 14^a hora de cultivo e, portanto, o cultivo foi interrompido após a aferição dos parâmetros da 15^a hora. Análises posteriores ao cultivo mostraram que no Grupo E o lactato tornou-se limitante na 13^a hora (0,05 g/L); e no Grupo F, na 14^a hora (0,46 g/L). A concentração máxima de OMV observada nestes cultivos foi de 319 mg/L na 15^a hora no grupo E; e 364 mg/L na 14^a hora no grupo F (**Tabela 11, Figura 14 e Figura 15; Tabela 12, Figura 16 e Figura 17**).

Tais valores confirmaram a hipótese de que potencialmente o valor máximo de concentração de OMV é obtido cerca de 1-2 horas após a retomada da porcentagem de oxigênio no meio (para aproximadamente 30%), sendo este instante do cultivo indicativo para o esgotamento da concentração de lactato no meio. Desse modo, como a concentração de ácidos orgânicos é determinada após o término do cultivo por HPLC, a porcentagem de oxigênio dissolvido no meio passou a ser uma variável importante para indicar o momento em que a principal fonte de carbono torna-se limitante no meio, gerando estresse bacteriano que resulta em uma maior vesiculação, e, portanto, o instante ótimo em que o cultivo deve ser interrompido.

Analisando esse parâmetro O₂D nos cultivos dos Grupos de A a F, observa-se que a concentração previamente estabelecida de 30% de oxigênio dissolvido no meio encontra-se limitante durante grande parte do cultivo. Dessa forma, o ensaio do Grupo G foi planejado para que a taxa de oxigênio dissolvido pudesse se manter constante no nível dos 30%, de modo que, ao longo do cultivo, não houvesse limitação deste

componente no meio. No entanto, conforme já discutido, esta condição não foi favorável ao crescimento bacteriano e à produção de OMV.

Em todos os cultivos realizados neste projeto o pH inicial foi ajustado para 7,0. A média dos valores de pH observados na hora zero de início dos cultivos foi de 7,18. A média dos valores de pH na última hora dos cultivos dos Grupos A, B, C e D, realizados por 12 horas, foi de 7,90. Já os cultivos dos Grupos E e F, realizados por 15 horas, tiveram valor médio na última hora de 8,39. O cultivo do Grupo G, apesar de ter tido duração de apenas 10 horas, apresentou o maior valor de pH na última hora, 8,90. Observa-se que quanto mais intensas as reações metabólicas, maior a libração de íons H⁺ e maior aumento do valor de pH. Um componente que pode ter sido produzido e que contribuiria para o aumento do pH é amônia.

Em resumo, o grupo que apresentou melhor concentração máxima de células (4,28 g/L) e de OMV (364 mg/L) foi o Grupo F (MC 3LA 2 AA 2 YE + pulso LA e AA; 15h). No entanto, para a continuidade dos estudos propostos neste projeto, que envolvem o tratamento das OMV e o preparo da formulação vacinal para testes imunológicos da função adjuvante, avaliou-se que o Grupo B apresentou o melhor custo-benefício dentre os demais cultivos. A condição do Grupo B (MC 3LA 2AA 2 YE; 12h) apresentou a segunda maior produção de OMV (mg/L), 340 mg/L, e a maior máxima produtividade de OMV (30,66 mgOMV/L.h); além do maior valor de conversão de substrato em produto (3,29 mg/g). Comparando este ensaio com o ensaio do Grupo F, este resultado foi considerado satisfatório para a obtenção das OMV pensando em uma produção em larga escala para fins comerciais, uma vez que, esta condição de cultivo foi realizada em batelada simples, sem acréscimo de pulsos e, portanto, com menos etapas no processo; além do fato dos resultados terem sidos obtidos com três horas a menos de cultivo.

5.2. Tratamento das Vesículas de Membrana Externa (OMV) com detergente

Há diferentes técnicas para se dosar o nível de endotoxinas em uma formulação, no entanto, a atividade endotóxica em geral é mensurada através do ensaio de *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL). Neste ensaio, a porção da molécula de endotoxina onde se encontra o lipídio-A pode ativar a gelificação do lisado de *Limulus*, possibilitando a comparação com níveis padrão de endotoxina de *Escherichia coli* (Claassen et al., 1996). Neste projeto, o LPS foi dosado indiretamente através da dosagem do KDO pelo método colorimétrico de Osborn (1963). KDO é a sigla para o ácido 2-keto-3-deoxyoctonato, e este ácido é utilizado pelas bactérias como intermediário para a síntese de lipopolissacarídeo. Este método também é conhecido como método do ácido tiobarbitúrico, componente utilizado no protocolo e que tem como característica marcar o LPS de bactérias gram-negativas (Karkhanis *et al.*, 1978). Dessa forma, é importante ressaltar que os valores de concentração de KDO apresentados se referem de forma indireta à concentração de LPS nas amostras.

Atualmente, conforme descrito na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), não existem níveis de endotoxina preestabelecidos para as vacinas de meningite. Os fabricantes de vacinas têm de mostrar que a vacina é segura e eficaz em ensaios clínicos (Brito e Singh, 2011). Limites de endotoxina para modelos animais de investigação pré-clínica em geral são estabelecidos com base na dose limiar de pirogênios (LPS) que, para humanos, é de cinco unidades de endotoxina por kg (EU/kg) (Malyala e Singh, 2008).

Em relação à concentração de KDO nas doses das vacinas, no primeiro ensaio imunológico (Experimento I), cada dose da formulação vacinal continha OMV tratadas com 0,5% DOC e a quantidade de KDO era em torno de 5,0.10⁻² µg/dose, cada dose de 10µL. No Experimento II, nas doses com formulação com OMV puras, a concentração de KDO foi de aproximadamente 40,0.10⁻² µg de KDO e na formulação com OMV tratadas com 0,3% DOC, esse valor foi cerca de 9,0.10⁻²µg de KDO/dose de 10µL.

A análise morfológica se fez necessária neste projeto, pois de acordo com Claassen *et al.* (Claassen *et al.*, 1996), em um contexto imunológico utilizando OMV como antígeno vacinal, as proteínas de membrana externa (OMP) precisam ser apresentadas em uma estrutura de membrana com conformação adequada. Conforme experiência relatada pelo grupo de Claassen, quando as OMV haviam sido desintegradas, assumindo uma conformação amorfa (*AGM - amorphous granular material*), observava-se que as OMP eram imunogênicas, no entanto, os anticorpos induzidos apresentavam baixa atividade bactericida.

Quando o tratamento foi realizado somente com TE, sem adição de detergente, observa-se, por microscopia eletrônica de transmissão, que as OMV se apresentam bem preservadas (**Figura 24A**), similares às OMV tratadas com 0,2% e 0,3% DOC (**Figura 25**). Com o tratamento com 0,5% DOC, verifica-se que parte das vesículas permanecem íntegras e parte fragmentadas (**Figura 24B**). OMV neste estado morfológico foram utilizadas em ensaios imunológicos e, o fato das OMV estarem parcialmente fragmentadas possibilitou avaliar se a morfologia das OMV tem influência na resposta adjuvante da formulação vacinal.

5.3. Ensaios Imunológicos

Foram realizados dois ensaios imunológicos para avaliação do efeito adjuvante das OMV de *N. lactamica* – Experimento I e Experimento II. O primeiro experimento teve como objetivo definir o cronograma de imunização e ajustar a dosagem das vacinas para que a interpretação dos resultados de proteção contra o desafio de morte fosse possível, uma vez que não foram encontrados na literatura ensaios com OMV de N. lactamica como adjuvante em combinação com o antígeno proposto neste estudo (PspA5 de S. pneumoniae). Desse modo, tomando como base resultados de experimentos realizados anteriormente por Oliveira et al. (2010), do qual avaliou a resposta imune do antígeno PspA5 em combinação com a célula inteira de Bordetella pertussis como adjuvante, estabeleceu-se a mesma dosagem de 5µg do antígeno e 5µg do adjuvante. As OMV utilizadas neste primeiro ensaio foram tratadas com DOC esta condição apresentou menor concentração 0,5%, porque de KDO, consequentemente, maior porcentagem de LOS eliminado.

No Experimento I, quando se analisa a concentração de anticorpos IgG induzidos após a primeira e segunda dose da vacina, comparando-se aos resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2010) em experimentos anteriores, verificou-se que a concentração de anticorpos após a segunda dose seria suficiente para observar resultados de proteção contra o desafio. Dessa forma, vinte dias após a segunda dose realizou-se o desafio letal, e foi definido para os próximos ensaios imunológicos o cronograma de duas doses administradas IN com intervalo de 15 dias.

O Experimento II teve como racional verificar se (1) as OMV em seu estado "puro", ou seja, sem tratamentos para a remoção do LOS, contribuiriam para um aumento significativo da resposta imune em relação às OMV tratadas, uma vez que o LOS presente na membrana externa pode atuar como adjuvante vacinal; e se (2) uma formulação com OMV tratadas com uma concentração menor de detergente (DOC 0,3%), apresentaria indução de anticorpos significativamente maior, menor ou igual à observada no Experimento I.

5.3.1. Efeito adjuvante das OMV de *Neisseria lactamica* – Resposta imune contra antígeno PspA5

Em ambos os Experimentos I e II, houve indução de anticorpo IgG específico contra PspA5 após a primeira e segunda dose das formulações vacinais. Nos dois experimentos esta indução foi estatisticamente mais alta ($p \le 0,0005$) nos grupos que receberam o antígeno PspA5 com OMV de *N. lactamica* como adjuvante em comparação ao grupo que recebeu a formulação somente com o antígeno e sem o adjuvante. Dessa forma, conclui-se que as OMV de *N. lactamica*, nas condições em que foram obtidas e tratadas, possuem atividade adjuvante detectável no modelo testado.

Os resultados do Experimento II mostraram que não houve diferença significativa entre as formulações com OMV pura e OMV tratadas, confirmando que a propriedade adjuvante das OMV observada nos ensaios deve-se às proteínas e demais componentes presentes na membrana externa das vesículas e não exclusivamente ao LOS presente nas OMV. Considerando ainda que, a concentração de anticorpos IgG foi semelhante entre o grupo PspA5-OMV tratadas com DOC 0,5% (Experimento I) e PspA5-OMV tratadas com DOC 0,3% (Experimento II), em média 10⁵ng/mL, assume-se que nas condições em que os experimentos foram realizados, a morfologia das OMV não influenciou na indução da resposta imune e nem na função adjuvante das OMV.

Em relação à concentração de anticorpos de subclasse de IgG, a análise do perfil de indução de IgG1 e IgG2a, contribui para o entendimento da via de indução da resposta imune. Sabe-se que adjuvantes podem induzir mudanças no balanço de células Th1-Th2 e, portanto, na subclasse de anticorpos gerados. Em camundongos, a imunoglobulina G1 (IgG1) está associada a uma resposta do tipo Th2, enquanto que uma resposta Th1 está associada com a indução de anticorpos IgG2a, IgG2b, IgG3. Cada subclasse de IgG pode contribuir para a eliminação de bactérias encapsuladas, como o pneumococo, por diferentes mecanismos (Lefeber *et al.*, 2003).

De modo geral, a célula T *helper* de tipo 1 (Th1) é proveniente de uma linhagem de células T efetoras CD4 + que promove respostas imunes mediadas por células,

necessárias para a defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos virais e bacterianos intracelulares. Células Th1 secretam IFN-gama, IL-2, IL-10 e TNF-alfa/beta. Essas citocinas promovem a ativação dos macrófagos, a produção de óxido nítrico e a proliferação de linfócitos T citotóxicos, que levam à fagocitose e à destruição de agentes patogênicos microbianos. Por outro lado, a célula T *helper* de tipo 2 (Th2) é originada de uma linhagem de células T efetoras CD4 + distinta que secretam interleucinas tipo IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, e IL-17E / IL-25. Essas células são necessárias para a imunidade humoral e desempenham um papel importante na coordenação da resposta imune a patógenos extracelulares (Abbas *et al.*, 1996).

Como observado nos resultados obtidos, a formulação vacinal proposta induziu resposta imune do tipo Th1 e Th2, com predominância do tipo Th2. Isso significa que a resposta imune gerada pela vacina tende a uma resposta imune adaptativa humoral, com geração de memória imunológica. Esta proporção Th1/Th2 coincide com o observado por outros autores avaliando a resposta imune contra antígeno PspA5 em associação com outros adjuvantes (Ferreira *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Salcedo-Rivillas *et al.*, 2014).

5.3.2. Sobrevivência após desafio letal com S. pneumoniae

Os resultados de sobrevivência ao desafio do Experimento I mostraram que OMV de *Neisseria lactamica,* nas condições em que foram obtidas e tratadas, possuem atividade adjuvante detectável no modelo testado, apresentando valores significativos de concentração de IgG anti-PspA5, e de sobrevivência dos animais após desafio letal com *S. pneumoniae* em comparação com a formulação sem adjuvante (PspA5).

Em relação ao Experimento II, o resultado de sobrevivência não apresentou valor estatisticamente significativo em relação ao controle para a formulação de PspA5 com OMVt0,3%. Este o resultado estatístico é decorrente de três animais do grupo PspA5 que sobreviveram aos 10 dias estabelecidos para observação de morte, apesar

de apresentarem características fisiológicas de inanição no 10º dia da observação, quando o experimento encerrou. De modo geral, camundongos de grupos controle submetidos a este regime vacinal morrem por volta do 4º ao 6º dia após desafio letal (Oliveira *et al.*, 2010; Salcedo-Rivillas *et al.*, 2014). Desse modo, a fim de contribuir para discussão deste trabalho, os resultados de sobrevivência foram considerados válidos para a estatística, apesar destes animais sobreviventes apresentarem-se debilitados. Para uma melhor conclusão deste resultado, o experimento deverá ser repetido.

5.3.3. Resposta imune contra antígeno OMV

Vários trabalhos já demonstraram que *N. lactamica* compartilha antígenos que apresentam reatividade cruzada com o meningococo (Troncoso *et al.*, 2000; Pollard e Frasch, 2001; Sánchez *et al.*, 2001; Troncoso *et al.*, 2002), e inclusive há diversos estudos que propõe o uso das OMV de *N. lactamica* como antígeno alternativo para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a doença meningocócica tipo B (Oliver *et al.*, 2002; Gorringe *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Gorringe *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2011; Salustiano, 2015).

Estudos anteriores realizados por nosso grupo avaliou o potencial antigênico de OMV de *N. lactamica* e suas frações. Por espectrometria de massas, foram identificadas 77 proteínas de membrana em OMV de *N. lactamica* e 54 proteínas de membrana em OMV de *N. lactamica* e 54 proteínas de membrana em OMV de *N. meningitidis*. Ensaios de imunoblote e ELISA demonstraram que os soros gerados contra proteínas isoladas PorB, Opa/Opc, e ComL de *N. lactamica* foram reativos com proteínas de *N. meningitidis*, assim como o soro anti-OMV de *N. lactamica* que reagiu com 6 proteínas de *N. meningitidis*: as proteínas App, Omp85, TbpB, Por A e PorB (Salustiano, 2015).

Dessa forma, apesar de não ser objetivo primário deste trabalho, os soros dos camundongos imunizados com OMV de *N. lactamica* foram utilizados para avaliar se

houve indução de resposta imune contra OMV de *N. meningitidis* B, em caráter complementar aos estudos de Salustiano (2015).

Em ambos os Experimentos I e II, os soros de animais imunizados com PspA5-OMVp de *N. lactamica* e PspA5-OMVt de *N. lactamica*) reconheceram proteínas de OMV de *N. meningitidis* B presentes na placa. Apesar de estarem em baixa concentração (~10²ng/mL no grupo PspA5-OMVp e PspA5-OMVt0,3%, e ~10³ng/mL no grupo PspA5-OMVt0,5%), essa indução indica uma possível evidência de reatividade cruzada. Este resultado, complementado aos resultados obtidos pelo grupo, sugerem a possibilidade do uso de *N. lactamica* como antígeno na produção de uma vacina contra a doença meningocócica B. Uma vacina desenvolvida com antígenos proteicos de *N. lactamica* tem o potencial de conferir proteção contra os diferentes sorogrupos de *N. meningitidis,* uma vez que devido à ausência de cápsula e da proteína PorA, a resposta não seria sorotipo e nem sorogrupo específica.

É importante ressaltar que apesar da observação da indução de anticorpos IgG anti-OMV de *N. lactamica* que reconhecem antígenos de *N. meningitidis* B, o parâmetro mais aceito para avaliar e correlacionar imunidade protetora, em modelo murino, é a atividade bactericida do soro (SBA), ainda não avaliada pelo grupo.

5.3.4. Ligação de anticorpos anti-PspA5 ao pneumococo

Os resultados deste ensaio foram importantes para demonstrar que somente quando OMV de *N. lactamica* estavam presentes na formulação, a ligação de anticorpos anti-PspA5 à superfície de *S. pneumoniae* ATCC6303 acontece. Essa constatação indica que além de aumentar a capacidade de indução de anticorpos IgG anti-PspA5, e de apresentar evidências de reatividade cruzada com antígenos de *N. meningitidis*, OMV de *N. lactamica* também são essenciais para garantir uma maior capacidade de ligação à superfície do pneumococo.

6. CONCLUSÃO

Em relação à etapa "Bioprocessos", a condição de cultivo MC 3LA2AA2YE (pulso LA 8^ah e AA 8^ah, 15h), grupo F, apresentou maior concentração de biomassa (4,28 g/L, 15^ah) e de OMV (364,14 mg/L, 14^ah) em relação aos demais meios utilizados e Prod P_{máx} de 25,92 mgOMV/L.h na 14^ah.

No entanto, o meio MC3LA2AA2YE (12h) foi estabelecido como sendo a melhor condição de cultivo para a obtenção de OMV de *N. lactamica,* cultivada nesta condição, pois apresentou maior produtividade máxima de OMV (Prod P_{máx}, 30,66 mgOMV/L.h) e a concentração de OMV obtida foi de 340,43 mg/L na 11^a hora. O cultivo em processo descontínuo, sem a adição de pulsos, possui a vantagem de ter um menor número de etapas e protocolos, garantindo um maior controle da produção, principalmente quando se tem como objetivo, cultivos futuros em maior escala.

De modo geral, com os cultivos realizados foi possível fazer algumas observações em relação à cinética de cultivo de *N. lactamica*, suas exigências nutricionais, metabolismo e perfil de liberação das OMV para o meio:

- A limitação da principal fonte de carbono, o lactato de sódio, pode ser um fator externo que reduz o crescimento bacteriano, gerando um ambiente hostil e estressante ao microrganismo que estimula o aumento da liberação das OMV para o meio;
- 2. A porcentagem de oxigênio dissolvido nos cultivos dos grupos de A a F se manteve entre 0,1% e 1,0% na maior parte do tempo. O aumento desta taxa para aproximadamente 30% durante o cultivo passou a ser uma variável importante para indicar que o microrganismo parou de crescer. Verificou-se, posteriormente, que este evento estava relacionado com o esgotamento do lactato de sódio no meio, consequentemente com o estresse bacteriano, sugerindo o momento em que o cultivo deveria ser interrompido para se obter um maior rendimento das OMV;

- 3. Os cultivos do grupo G foram realizados com oxigênio dissolvido mantido a 30% durante a maior parte do cultivo. Para manter o oxigênio nesta taxa os cultivos foram realizados com borbulhamento de ar pela parte inferior do biorreator. O ar borbulhado gerou a produção excessiva de espuma no meio e foi necessário o uso do antiespumante por duas a três vezes durante o cultivo. Em consequência da espuma, parte das OMV provavelmente se perdeu na parede do biorreator, e juntamente com o uso do antiespumante, o rendimento final das OMV neste grupo foi menor em relação aos demais;
- 4. N. lactamica parece alterar sua via metabólica e consumir o acetato e o citrato produzidos como metabólitos secundários, como alternativa à limitação do lactato de sódio. No entanto, observa-se que mesmo com esses dois nutrientes disponíveis, o crescimento estaciona provavelmente porque outro nutriente, ainda não identificado, poderia ser um outro fator limitante, a ser demonstrado.

No que diz respeito à etapa "Tratamento das OMV", o tratamento utilizando DOC na concentração 0,5% foi o mais eficiente na remoção de LOS das OMV, retirando 86% de KDO. Por este motivo, as OMV tratadas com esta condição foram escolhidas para testes iniciais da função adjuvante. Análises posteriores de microscopia eletrônica mostraram que em todos os tratamentos encontram-se vesículas íntegras, com exceção das OMV tratadas com DOC 0,5%, onde além de vesículas preservadas, observa-se também OMV rompidas.

Na etapa "Ensaios Imunológicos", dados obtidos apontaram para uma atividade adjuvante das OMV em combinação com o antígeno PspA5, neste esquema e modelo de imunização. A presença das OMV na formulação vacinal conferiu maior capacidade de indução de IgG anti-PspA5. Como consequência provável dos níveis mais altos de anticorpos anti-PspA5 induzidos, foi observada uma maior ligação de IgG à superfície do pneumococo em ensaios *in vitro*. Concluiu-se também que não houve diferença significativa entre as formulações com OMV pura e OMV tratada com 0,3% e 0,5% de DOC, portanto, a propriedade adjuvante das OMV avaliadas neste projeto deve-se às proteínas e demais componentes presentes nesta estrutura e não exclusivamente ao LOS presente nas mesmas.

142

A presença das OMV em todas as formulações com a proteína heteróloga PspA5 de *S. pneumoniae* aumentou o potencial protetor da vacina, evidenciando sua função adjuvante. Além disso, as OMV de *N. lactamica* foram capazes de induzir a produção de anticorpos em animais imunizados, sendo capazes de reconhecer antígenos de OMV de *N. meningitidis* B.
REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature,** v. 383, n. 6603, p. 787-93, Oct 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893001</u> >.

ACEVEDO, R. et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. **Front Immunol,** v. 5, p. 121, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24715891</u> >.

AGHASADEGHI, M. R. et al. Application of outer membrane vesicle of Neisseria meningitidis serogroup B as a new adjuvant to induce strongly Th1-oriented responses against HIV-1. **Curr HIV Res,** v. 9, n. 8, p. 630-5, Dec 2011. ISSN 1873-4251. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211657 >.

AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J Immunol Methods,** v. 132, n. 2, p. 191-5, Sep 1990. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170533</u> >.

ALANIZ, R. C. et al. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of Salmonella typhimurium that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. **J Immunol**, v. 179, n. 11, p. 7692-701, Dec 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025215 >.

ASENSIO, C. J. et al. Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. **Vaccine,** v. 29, n. 8, p. 1649-56, Feb 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21211579 >.

BAART, G. J. et al. Modeling Neisseria meningitidis metabolism: from genome to metabolic fluxes. **Genome Biol,** v. 8, n. 7, p. R136, 2007. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617894</u> >.

BACHMANN, M. F.; JENNINGS, G. T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 11, p. 787-96, Nov 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948547 >.

BARUQUE-RAMOS, J. et al. Accumulation of organic acids in cultivations of Neisseria meningitidis C. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 10, p. 869-77, Oct 2006. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736170</u> >.

BAUMGARTEN, T. et al. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances Pseudomonas putida DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 17, p. 6217-24, Sep 2012. ISSN 1098-5336. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752175 >.

BENNETT, J. S. et al. Independent evolution of the core and accessory gene sets in the genus Neisseria: insights gained from the genome of Neisseria lactamica isolate 020-06. **BMC Genomics,** v. 11, p. 652, 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092259</u> >.

BEVERIDGE, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **J Bacteriol**, v. 181, n. 16, p. 4725-33, Aug 1999. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438737</u> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051</u> >.

BRITO, L. A.; SINGH, M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 1, p. 34-7, Jan 2011. ISSN 1520-6017. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20575063</u> >.

BURDETT, I. D.; MURRAY, R. G. Electron microscope study of septum formation in Escherichia coli strains B and B-r during synchronous growth. **J Bacteriol**, v. 119, n. 3, p. 1039-56, Sep 1974. ISSN 0021-9193. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4604418 >.

CATLIN, W. Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirement for gonococcal typing. **Journal of Infectious Diseases**, v. 128, n. 2, p. 178-194, 1973.

CLAASSEN, I. et al. Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. **Vaccine,** v. 14, n. 10, p. 1001-8, Jul 1996. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873395</u> >.

DAGAN, R. New insights on pneumococcal disease: what we have learned over the past decade. **Vaccine,** v. 27 Suppl 3, p. C3-5, Aug 2009. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19552985</u> >.

DARRIEUX, M. et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 3, p. 273-8, Mar

2008. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287288</u> >.

DE KLEIJN, E. D. et al. Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. **Vaccine**, v. 18, n. 15, p. 1456-66, Feb 2000. ISSN 0264-410X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618543 >.

DEL CAMPO, J. et al. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1193-200, Feb 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945418</u> >.

DEVOE, I. W.; GILCHRIST, J. E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of Neisseria meningitidis. **J Exp Med,** v. 138, n. 5, p. 1156-67, Nov 1973. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4200775</u> >.

DRABICK, J. J. et al. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. **Vaccine**, v. 18, n. 1-2, p. 160-72, Aug 1999. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501246</u> >.

ELLIS, T. N.; KUEHN, M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 74, n. 1, p. 81-94, Mar 2010. ISSN 1098-5557. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197500 >.

ETCHART, N. et al. Intranasal immunisation with inactivated RSV and bacterial adjuvants induces mucosal protection and abrogates eosinophilia upon challenge. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 5, p. 1136-44, May 2006. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619288</u> >.

EVANS, C. M. et al. Nasopharyngeal colonization by Neisseria lactamica and induction of protective immunity against Neisseria meningitidis. **Clin Infect Dis,** v. 52, n. 1, p. 70-7, Jan 2011. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148522</u> >.

FATEH, A. et al. New insight into the application of outer membrane vesicles of Gram negative

bacteria. Vaccine Research. 2: 93-96 p. 2016.

FDA. **Common Ingredients in U.S. Licensed Vaccines**. <u>Vaccines</u>, <u>Blood & Biologics</u>. United States 2014.

FEAVERS, I. M.; PIZZA, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. **Vaccine**, v. 27 Suppl 2, p. B42-50, Jun 2009. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481315 >.

FERRARI, G. et al. Outer membrane vesicles from group B Neisseria meningitidis delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1856-66, Mar 2006. ISSN 1615-9853. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16456881 >.

FERREIRA, D. M. et al. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 5, p. 636-45, May 2009. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279169</u> >.

FINNE, J.; LEINONEN, M.; MÄKELÄ, P. H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. **Lancet,** v. 2, n. 8346, p. 355-7, Aug 1983. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6135869</u> >.

FINNEY, M. et al. Characterization of the key antigenic components and pre-clinical immune responses to a meningococcal disease vaccine based on Neisseria lactamica outer membrane vesicles. **Hum Vaccin,** v. 4, n. 1, p. 23-30, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1554-8619. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921703</u> >.

FREDRIKSEN, J. H. et al. Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. **NIPH Ann,** v. 14, n. 2, p. 67-79; discussion 79-80, Dec 1991. ISSN 0332-5652. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1812438 >.

FU, J. et al. Recent advances in the large scale fermentation of Neisseria meningitidis group B for the production of an outer membrane protein complex. **Biotechnology (N Y),** v. 13, n. 2, p. 170-4, Feb 1995. ISSN 0733-222X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634759 >.

FUKASAWA, L. O. et al. Immune response to native NadA from Neisseria meningitidis and its expression in clinical isolates in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 2, p. 121-5, Feb 2003. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543917</u> >.

GARCIA, M. W. *Neisseria lactamica*: Cinética do Crescimento e Rendimento de Vesículas de Membrana Externa. <u>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS</u>. São Paulo-SP: Universidade Presbiteriana Mackenzie. Bacharelado: 45 p. 2011a. _____. Neisseria lactamica: Cinética do Crescimento e Rendimento de Vesículas de Membrana ExternaNeisseria lactamica: Cinética do Crescimento e Rendimento de Vesículas de Membrana Externa. <u>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS</u>. São Paulo-SP: Universidade Presbiteriana Mackenzie. Bacharelado: 45 p. 2011b.

GERRITZEN, M. J. H. et al. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. **Biotechnol Adv,** v. 35, n. 5, p. 565-574, Sep 2017. ISSN 1873-1899. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28522212 >.

GINSBERG, L. Difficult and recurrent meningitis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry,** v. 75 Suppl 1, p. i16-21, Mar 2004. ISSN 0022-3050. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978146</u> >.

GIULIANI, M. M. et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proc Natl** Acad Sci U S A, v. 103, n. 29, p. 10834-9, Jul 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825336</u> >.

GOLD, R. et al. Carriage of Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica in infants and children. **J Infect Dis,** v. 137, n. 2, p. 112-21, Feb 1978. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/415097</u> >.

GONÇALVES, B. I. Estudo do crescimento de *Neisseria lactamica*Estudo do crescimento de Neisseria lactamica. 2008. 33 (Bacharelado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo-SP.

_____. **Cinética do cultivo de** *N. lactamica* em biorreator. 155 f. Dissertação. 2012. 155 (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.

GORRINGE, A. et al. The development of a meningococcal disease vaccine based on Neisseria lactamica outer membrane vesicles. **Vaccine,** v. 23, n. 17-18, p. 2210-3, Mar 2005. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755597</u> >.

GORRINGE, A. R. et al. Phase I safety and immunogenicity study of a candidate meningococcal disease vaccine based on Neisseria lactamica outer membrane vesicles. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 8, p. 1113-20, Aug 2009. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553555</u> >.

GORRINGE, A. R.; VAN ALPHEN, L. 16th International Pathogenic Neisseria Conference: recent progress towards effective meningococcal disease vaccines. **Hum** **Vaccin,** v. 5, n. 2, p. 53-6, Feb 2009. ISSN 1554-8619. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684470</u> >.

GRENIER, D.; MAYRAND, D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by Bacteroides gingivalis. **Infect Immun,** v. 55, n. 1, p. 111-7, Jan 1987. ISSN 0019-9567. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3539799 >.

GUJRATI, V. B.; JON, S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles: what is their potential in cancer therapy? **Nanomedicine (Lond),** v. 9, n. 7, p. 933-5, May 2014. ISSN 1748-6963. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24978458 >.

GUPTA, R. K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 32, n. 3, p. 155-172, Jul 1998. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837642</u> >.

GUTHRIE, T. et al. Local and systemic antibody responses in mice immunized intranasally with native and detergent-extracted outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis. **Infect Immun,** v. 72, n. 5, p. 2528-37, May 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102760 >.

HAURAT, M. F. et al. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. **J Biol Chem**, v. 286, n. 2, p. 1269-76, Jan 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056982 >.

HOEKSTRA, D. et al. Release of outer membrane fragments from normally growing Escherichia coli. **Biochim Biophys Acta,** v. 455, n. 3, p. 889-99, Dec 1976. ISSN 0006-3002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/793634 >.

HOLST, J. et al. Properties and clinical performance of vaccines containing outer
membrane vesicles from Neisseria meningitidis. Vaccine, v. 27 Suppl 2, p. B3-12, Jun
2009. ISSN 1873-2518. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481313 >.

_____. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. **Hum Vaccin Immunother,** v. 9, n. 6, p. 1241-53, Jun 2013. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23857274</u> >.

HORSTMAN, A. L.; KUEHN, M. J. Enterotoxigenic Escherichia coli secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. **J Biol Chem,** v. 275, n. 17, p. 12489-96, Apr 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777535</u> >.

KADURUGAMUWA, J. L.; BEVERIDGE, T. J. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. **J Bacteriol**, v. 178, n. 10, p. 2767-74, May 1996. ISSN 0021-9193. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631663 >.

_____. Membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa and Shigella flexneri can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. **Microbiology**, v. 145 (Pt 8), p. 2051-60, Aug 1999. ISSN 1350-0872. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463171 >.

KARKHANIS, Y. D. et al. A new and improved microassay to determine 2-keto-3deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. **Anal Biochem,** v. 85, n. 2, p. 595-601, Apr 1978. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/646115</u> >.

KATIAL, R. K. et al. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. **Infect Immun,** v. 70, n. 2, p. 702-7, Feb 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796602</u> >.

KEGG. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 2017.

KLIMENTOVÁ, J.; STULÍK, J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. **Microbiol Res**, v. 170, p. 1-9, Jan 2015. ISSN 1618-0623. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25458555 >.

KUEHN, M. J.; KESTY, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the hostpathogen interaction. **Genes Dev,** v. 19, n. 22, p. 2645-55, Nov 2005. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291643</u> >.

KULKARNI, H. M.; JAGANNADHAM, M. V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 10, p. 2109-21, Oct 2014. ISSN 1465-2080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069453 >.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annu Rev Microbiol**, v. 64, p. 163-84, 2010. ISSN 1545-3251. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20825345</u> >.

KUMAR, S. et al. Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. **J Control Release,** v. 220, n. Pt A, p. 141-148, Dec 2015. ISSN 1873-4995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437263 >.

LAPPANN, M. et al. Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of Neisseria meningitidis. **J Bacteriol**, v. 195, n. 19, p. 4425-35, Oct 2013. ISSN 1098-5530. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23893116 >.

LEFEBER, D. J. et al. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to Streptococcus pneumoniae type 3. **Infect Immun**, v. 71, n. 12, p. 6915-20, Dec 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638780</u> >.

LEIGHTON, M. P. et al. An NMR and enzyme study of the carbon metabolism of Neisseria meningitidis. **Microbiology,** v. 147, n. Pt 6, p. 1473-82, Jun 2001. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390678</u> >.

LI, Y. et al. Immunization with live Neisseria lactamica protects mice against meningococcal challenge and can elicit serum bactericidal antibodies. **Infect Immun,** v. 74, n. 11, p. 6348-55, Nov 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966413</u> >.

LI, Z.; CLARKE, A. J.; BEVERIDGE, T. J. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. **J Bacteriol**, v. 180, n. 20, p. 5478-83, Oct 1998. ISSN 0021-9193. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765585 >.

LOEB, M. R.; KILNER, J. Release of a special fraction of the outer membrane from both growing and phage T4-infected Escherichia coli B. **Biochim Biophys Acta**, v. 514, n. 1, p. 117-27, Dec 1978. ISSN 0006-3002. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/363149 >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry,** v. 193, p. 256-257, 1951.

MACDONALD, I. A.; KUEHN, M. J. Stress-induced outer membrane vesicle production by Pseudomonas aeruginosa. **J Bacteriol**, v. 195, n. 13, p. 2971-81, Jul 2013. ISSN 1098-5530. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625841 >.

MALYALA, P.; SINGH, M. Endotoxin limits in formulations for preclinical research. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 6, p. 2041-4, Jun 2008. ISSN 0022-3549. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17847072</u> >.

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. **BMC Microbiol**, v. 11, p. 258, Dec 2011. ISSN 1471-2180. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133164 >.

MARTIN, D. R. et al. New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B:4:P1.4. **J Infect Dis,** v. 177, n. 2, p. 497-500, Feb 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466547 >.

MASHBURN-WARREN, L.; MCLEAN, R. J.; WHITELEY, M. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. **Geobiology**, v. 6, n. 3, p. 214-9, Jun 2008. ISSN 1472-4669. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18459967</u> >.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 3, p. 411-6, Jun 2010. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20466528</u> >.

MCBROOM, A. J.; KUEHN, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gramnegative bacteria is a novel envelope stress response. **Mol Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 545-58, Jan 2007. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163978</u> >.

MILLER, J. M. et al. Conjugate Meningococcal Vaccines Development: GSK Biologicals Experience. **Adv Prev Med,** v. 2011, p. 846756, 2011. ISSN 2090-3499. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21991444 >.

MORENO, A. T. et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin Vaccine Immunol,** v. 17, n. 3, p. 439-46, Mar 2010. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089795</u> >.

MOSHIRI, A. et al. Outer membrane vesicle: a macromolecule with multifunctional activity. **Hum Vaccin Immunother,** v. 8, n. 7, p. 953-5, Jul 2012. ISSN 2164-554X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699443 >.

MULLANEY, E. et al. Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen Helicobacter pylori. **Proteomics Clin Appl,** v. 3, n. 7, p. 785-96, Jul 2009. ISSN 1862-8354. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21136987 >.

MÜLLER, H.; HINTON, J. A. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med,** v. 48, p. 330, 1941.

O'RYAN, M. et al. A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program. **Drugs,** v. 74, n. 1, p. 15-30, Jan 2014. ISSN 1179-1950. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338083 >.

OLIVEIRA, M. L. et al. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. **PLoS One,** v. 5, n. 5, p. e10863, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523738</u> >.

OLIVER, K. J. et al. Neisseria lactamica protects against experimental meningococcal infection. **Infect Immun,** v. 70, n. 7, p. 3621-6, Jul 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065503</u> >.

OSBORN, M. J. STUDIES ON THE GRAM-NEGATIVE CELL WALL. I. EVIDENCE FOR THE ROLE OF 2-KETO- 3-DEOXYOCTONATE IN THE LIPOPOLYSACCHARIDE OF SALMONELLA TYPHIMURIUM. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 50, p. 499-506, Sep 1963. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14067096 >.

PATHIRANA, R. D.; KAPARAKIS-LIASKOS, M. Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, immune regulation and pathogenesis. **Cell Microbiol**, v. 18, n. 11, p. 1518-1524, Nov 2016. ISSN 1462-5822. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27564529 >.

PEETERS, C. C. et al. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. **Vaccine,** v. 14, n. 10, p. 1009-15, Jul 1996. ISSN 0264-410X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873396 >.

PETOUSIS-HARRIS, H. et al. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective casecontrol study. **Lancet**, v. 390, p. 1603–10, Sep 2017. Disponível em: < <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28705462</u> >.

POLLARD, A. J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to Neisseria meningitidis. **Vaccine,** v. 19, n. 11-12, p. 1327-46, Jan 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163654</u> >.

POST, D. M. et al. Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from Neisseria meningitidis serogroup B. **J Biol Chem,** v. 280, n. 46, p. 38383-94, Nov 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103114 >.

PRACHAYASITTIKUL, V. et al. EDTA-induced membrane fluidization and destabilization: biophysical studies on artificial lipid membranes. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),** v. 39, n. 11, p. 901-13, Nov 2007. ISSN 1745-7270. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989882 >.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res,** v. 37, n. 8, p. 1103-9, Aug 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273812</u> >.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine,** v. 19, n. 17-19, p. 2688-91, Mar 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257410</u> >.

REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**, v. 30, n. 1, p. 23-32, Jan 2009. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059004</u> >.

ROIER, S. et al. Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. **Microb Cell,** v. 3, n. 6, p. 257-259, May 2016. ISSN 2311-2638. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357362 >.

SALCEDO-RIVILLAS, C. et al. Pertussis Toxin Improves Immune Responses to a Combined Pneumococcal Antigen and Leads to Enhanced Protection against Streptococcus pneumoniae. **Clin Vaccine Immunol,** v. 21, n. 7, p. 972-81, Jul 2014. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807055</u> >.

SALUSTIANO, G. F. C. L. **Cinética de crescimento e produção de vesículas de membrana externa de** *Neisseria lactamica* **em agitador rotativo. 2010a. 46 (Bacharelado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo-SP.**

_____. Cinética de crescimento e produção de vesículas de membrana externa de *Neisseria lactamica* em agitador rotativoCinética de crescimento e produção de vesículas de membrana externa de Neisseria lactamica em agitador rotativo. 2010b. 46 (Bacharelado). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo-SP.

_____. Comparação entre Neisseria meningitidis e Neisseria lactamica: cinética do cultivo e potencial antigênico de OMV e frações. 2015. 177 (Doutorado). Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT da Universidade deSão Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SALUSTIANO, G. F. C. L.; CUNHA, J. P. C.; SCHENKMAN, R. P. F. Immunoproteomic approach for identification of target proteins involved in cross-reactivity between *N. meningitidis* and *N. lactamica*Immunoproteomic approach for identification of target proteins involved in cross-reactivity

between N. meningitidis and N. lactamica. XXXIX Congress of the Brazilian Society of Immunology. Búzios-RJ, Brazil 2014.

SANTOLAYA, M. E. et al. Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 617-24, Feb 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260988</u> >.

SANTOS, S. **Cinética do cultivo em biorreator de** *Neisseria meningitidis* **sorogrupo B**. 2007. 155 (Mestre em biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, S. et al. Outer membrane vesicles (OMV) production of Neisseria meningitidis serogroup B in batch process. **Vaccine,** v. 30, n. 42, p. 6064-9, Sep 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867717</u> >.

SARDIÑAS, G. et al. Outer membrane vesicles of Neisseria lactamica as a potential mucosal adjuvant. **Vaccine,** v. 24, n. 2, p. 206-14, Jan 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115701</u> >.

SAUNDERS, N. B. et al. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. **Infect Immun,** v. 67, n. 1, p. 113-9, Jan 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864204 >.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 10, p. 605-19, Oct 2015. ISSN 1740-1534. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26373371 >.

SCHWECHHEIMER, C.; SULLIVAN, C. J.; KUEHN, M. J. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. **Biochemistry**, v. 52, n. 18, p. 3031-40, May 2013. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521754</u> >.

SEIB, K. L.; ZHAO, X.; RAPPUOLI, R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. **Clin Microbiol Infect**, v. 18 Suppl 5, p. 109-16, Oct 2012. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882709</u> >.

SHARIFAT SALMANI, A. et al. Outer membrane vesicle of Neisseria meningitidis serogroup B as an

adjuvant to induce specific antibody response against the lipopolysaccharide

of Brucella abortus S99. **Annals of Microbiology,** v. 59, p. 145-149, 2009. Disponível em: < https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF03175612.pdf >.

SIERRA, G. V. et al. Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba. **NIPH Ann,** v. 14, n. 2, p. 195-207; discussion 208-10, Dec 1991. ISSN 0332-5652. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1812432 >.

SÁNCHEZ, S. et al. Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of crossbactericidal activity in pathogenic and commensal Neisseria. **Vaccine**, v. 19, n. 25-26, p. 3390-8, May 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348703</u> >.

TAI, S. S. Streptococcus pneumoniae protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit Rev Microbiol,** v. 32, n. 3, p. 139-53, 2006. ISSN 1040-841X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893751</u> >.

TAMARGO, B. et al. New proteoliposome vaccine formulation from N. meningitidis
serogroup B, without aluminum hydroxide, retains its antimeningococcal protectogenic
potential as well as Th-1 adjuvant capacity. **BMC Immunol**, v. 14 Suppl 1, p. S12,
2013. ISSN 1471-2172. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458443 >.

THORNTON, V. et al. Safety and immunogenicity of New Zealand strain meningococcal serogroup B OMV vaccine in healthy adults: beginning of epidemic control. **Vaccine**, v. 24, n. 9, p. 1395-400, Feb 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242221 >.

TRONCOSO, G. et al. Analysis of Neisseria lactamica antigens putatively implicated in acquisition of natural immunity to Neisseria meningitidis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 9-15, Sep 2002. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208601</u> >.

_____. Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of Neisseria meningitidis and commensal Neisseria species. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 27, n. 2, p. 103-9, Feb 2000. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640604</u> >.

VAN DE WATERBEEMD, B. et al. Improved OMV vaccine against Neisseria meningitidis using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. **Vaccine**, v. 28, n. 30, p. 4810-6, Jul 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483197 >.

_____. Identification and optimization of critical process parameters for the production of NOMV vaccine against Neisseria meningitidis. **Vaccine,** v. 30, n. 24, p. 3683-90, May 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464965 >.

_____. Improved production process for native outer membrane vesicle vaccine against Neisseria meningitidis. **PLoS One,** v. 8, n. 5, p. e65157, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741478</u> >.

VAN DER LEY, P. et al. Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp. **Infect Immun,** v. 59, n. 9, p. 2963-71, Sep 1991. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652557</u> >.

_____. Modification of lipid A biosynthesis in Neisseria meningitidis lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. **Infect Immun,** v. 69, n. 10, p. 5981-90, Oct 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553534 >.

VAN DER POL, L.; STORK, M.; VAN DER LEY, P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. **Biotechnol J,** v. 10, n. 11, p. 1689-706, Sep 2015. ISSN 1860-7314. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912077 >.

WENSINK, J.; WITHOLT, B. Outer-membrane vesicles released by normally growing Escherichia coli contain very little lipoprotein. **Eur J Biochem,** v. 116, n. 2, p. 331-5, May 1981. ISSN 0014-2956. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7018907 >.

WHO. Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type B conjugated vaccine. World Health Organization. **Technical Report Series**, n. 897, 2000. Disponível em: < http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/influenza/WHO_TRS_8 97 A1.pdf?ua=1 >.

WHO. Pneumococcal vaccines WHO position paper – 2012. **Weekly epidemiological record**. World Health Organization. n. 14, 87, 129–144. Apr 2012. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <u>http://www.who.int/wer/2012/wer8714.pdf?ua=1</u> >.

XIANG, S. D. et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1-9, Sep 2006. ISSN 1046-2023. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997708 >.

ZHOU, L. et al. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Lett,** v. 163, n. 2, p. 223-8, Jun 1998. ISSN 0378-1097. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673026 >. ZOLLINGER, W. D. et al. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. **J Clin Invest**, v. 63, n. 5, p. 836-48, May 1979. ISSN 0021-9738. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/109466 >.

ZOLLINGER, W. D.; MORAN, E. Meningococcal vaccines--present and future. **Trans R Soc Trop Med Hyg,** v. 85 Suppl 1, p. 37-43, 1991. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1803695</u> >.

APÊNDICES

Componentes	MC Original	MC3LA3AA3YE	MC3LA2AA2YE
	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Cloreto de sódio	5,844	5,844	5,844
Cloreto de amônia	0,401	0,401	0,401
Cloreto de potássio	0,186	0,186	0,186
Cloreto de cálcio	0,037	0,037	0,037
Citrato de sódio	0,647	0,647	0,647
Sulfato de magnésio	0,616	0,616	0,616
Sulfato de manganês	0,001	0,001	0,001
Ácido L-glutâmico	1,180	3,540	2,360
L-arginina. HCl	0,105	0,315	0,210
Glicina	0,151	0,453	0,302
L-serina	0,021	0,063	0,042
L-cisteína	0,011	0,033	0,022
Glicerol	5,010	5,010	5,010
DL-Lactato de sódio	7,510	22,53	22,53
Fosfato de sódio	1,062	1,062	1,062
Fosfato de potássio	0,171	0,171	0,171
Extrato de Levedura	-	3,0	2,0

Apêndice 1 - Meio de cultura de Catlin (1973) sem ferro (MC) e com concentrações de lactato e de aminoácidos modificadas (g/L).

Aminoácidos	% livre no VE	Concentração
Ammodoluos		(g aác./g YE)
Alanina	4,8	0,048
Arginina	1,5	0,015
Asparagina	1,2	0,012
Ácido Aspártico	1,7	0,017
Cisteína	0,2	0,002
Ácido Glutâmico	6,8	0,068
Glutamina	0,3	0,003
Glicina	1,3	0,013
Histidina	0,6	0,006
Isoleucina	1,8	0,018
Leucina	2,8	0,028
Lisina	2,2	0,022
Metionina	0,7	0,007
Fenilalanina	2,1	0,021
Prolina	0,9	0,009
Serina	1,6	0,016
Treonina	1,3	0,013
Triptofano	0,5	0,005
Tirosina	0,5	0,005
Valina	2,4	0,024

Apêndice 2 - Aminoácidos presentes no extrato de levedura ultrafiltrado (YE, BD/DifcoTM): porcentagem de aminoácidos livres e concentração do aminoácido por grama de extrato de levedura. Fonte: BD BionutrientsTM Technical Manual.

Apêndice 3 – Soluções e Meio de Cultivo. Ensaios Imunológicos

Soluções:

• PBS (Solução tampão salina fosfato) 10X: NaCl 1,37 M, KCl 27 M, Na2HPO4

100 mM, KH2PO4 14 mM pH 7,4.

- PBS-T: PBS 1X e Tween ® 20 a 0,1 %.
- Solução tampão carbonato-bicarbonato: Na2CO3 50 mM e NaHCO3 50 mM, pH 9,6.
- Solução tampão citrato-fosfato: Citrato de sódio 100 mM e fosfato de sódio

monobásico (NaH2PO4) 300 mM pH 5,0.

Meio de Cultivo:

• Meio líquido THY: Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5% de extrato de levedura.

Apêndice 4 - Correlação dos pontos de DO₅₄₀ pela massa seca (g/L). A. MC 3LA3AA3YE. B. MC 3LA2AA2YE. C. MC 3LA2AA2YE com pulso de aminoácidos na 8ª hora. D. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora e F. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. MC – meio de Catlin sem ferro. LA – lactato. YE – extrato de levedura ultrafiltrado. O número 2 ou 3 à frente de cada sigla corresponde a quantas vezes o componente teve sua concentração dobrada (2) ou triplicada (3) em relação ao meio original de Catlin.



Apêndice 5 - Logaritmo neperiano da concentração celular (massa seca) ℓn (X/X₀) em função do tempo. No intervalo de tempo em que o crescimento é exponencial (da hora zero à hora 3), fez-se a regressão linear dos pontos e o coeficiente angular da equação da reta obtida corresponde à velocidade específica máxima de crescimento (µxmáx) no cultivo. A. MC 3LA3AA3YE. B. MC 3LA2AA2YE. C. MC 3LA2AA2YE com pulso de aminoácidos na 8ª hora. D. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora. E. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato na 8ª hora e F. MC 3LA2AA2YE com pulso de lactato e aminoácidos na 8ª hora. VE – extrato de levedura ultrafiltrado. O número 2 ou 3 à frente de cada sigla corresponde a quantas vezes o componente teve sua concentração dobrada (2) ou triplicada (3) em relação ao meio original de Catlin.



Apêndice 5 – Continuação. Logaritmo neperiano do crescimento bacteriano In (X/X0) em função do tempo. No intervalo de tempo em que o crescimento é exponencial (da hora zero à hora 3), fez-se a regressão linear dos pontos e o coeficiente angular da equação da reta obtida corresponde à velocidade específica máxima de crescimento (µ_{xmáx}) no cultivo. G. MC 3LA2AA2YE com borbulhamento de ar e pulso de lactato e aminoácidos na 6^a hora. O número 2 ou 3 à frente de cada sigla corresponde a quantas vezes o componente teve sua concentração dobrada (2) ou triplicada (3) em relação ao meio original de Catlin.

