

CAMILA DE MOURA PEREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DOS DIFERENTES ACEPTORES DE ELÉTRONS NOS CULTIVOS DE
Haemophilus influenzae TIPO B EM ANAEROBIOSE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

São Paulo
2016

CAMILA DE MOURA PEREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DOS DIFERENTES ACEPTORES DE ELÉTRONS NOS CULTIVOS DE
Haemophilus influenzae TIPO B EM ANAEROBIOSE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Mickie Takagi

Versão original

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Camila de Moura Pereira dos.

Estudo dos diferentes aceptores de elétrons nos cultivos de
Haemophilus influenzae tipo b em anaerobiose / Camila de Moura
Pereira dos Santos. – São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Mickie Takagi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia industrial.

Versão do título para o inglês: Study of different electron acceptor for
Haemophilus influenzae type b in anaerobic cultivation.

1. *Haemophilus influenzae* b 2. Anaerobiose 3. Aceptor de elétron
4. Metabolismo 5. Fumarato 6. DMSO I. Takagi, Prof. Dr. Mickie II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB02/2016

Título da Dissertação: Estudo dos diferentes aceptores de elétrons nos cultivos de *Haemophilus influenzae* tipo b em anaerobiose.

Orientador(a): Prof. Dr. Mickie Takagi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Para chegar até a conclusão desse trabalho, com toda certeza não estive sozinha. Seja do ambiente de trabalho, seja fora dele, eu pude contar com muitas pessoas que foram essenciais, de uma forma ou de outra, e contribuíram para a realização dele. Primeiramente, quero agradecer a toda equipe que compõem o Laboratório de Bioprocessos I do Instituto Butantan. A minha orientadora, Dra. Mickie Takagi, pois sem a oportunidade para que eu pudesse me desenvolver e aprender, não teria acontecido esse projeto. Obrigada a equipe técnica, seu “Louri” (Lourivaldo), seu Hélio e Kadu (Carlos Eduardo), por toda boa vontade e comprometimento na preparação dos materiais necessários em cada experimento, soluções, dicas e ajuda com o meu trabalho. Não somente o trabalho, obrigada pela amizade, por deixar a rotina de trabalho mais agradável e divertida. Kadu, obrigada pelas indicações de livros, filmes e bandas. Pela companhia no metro, todas as nossas conversas e ter sido amigo, não só colega de trabalho. Obrigada a Ana, a Aninha, além de todo trabalho de assistência com toda vidraria, foi também uma mãe, com conselhos e cuidados. Você foi parte essencial nesses três anos. Obrigada a Cláudia, última a integrar a equipe técnica e nem por isso, menos especial. Foi minha companheira no (duro) aprendizado de HPLC, de cultivos e também, na vida! Obrigada por todo apoio, dentro e fora do laboratório. Ainda temos que montar nosso negócio! Obrigada ao Dr. Joaquin Cabrera-Crespo, por todas as ideias e discussões de resultados desde meus tempos de PAP, passando para o meu mestrado. E obrigada por todas as conversas no almoço, sempre com discussões divertidas!

Muito obrigada a todos os colaboradores do Laboratório Piloto de Produtos Recombinantés. Agradeço a equipe técnica por todo o apoio nos longos cultivos e na preparação dos meios e materiais utilizados. Obrigada em especial ao Celso, por ter permitido o uso das instalações do Piloto e todo momento estive disposto a ajudar no que eu precisasse. Obrigada pelas conversas nas horas de cultivo, pela discussão dos resultados, pelo apoio técnico e companhia em cada experimento.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioprocessos III, que foram parte de toda essa jornada, quando o laboratório de Bioprocessos era um só. Stefanie, a menina “lady”, como gosto de lembrar, obrigada pelos conselhos, tanto profissionais como de vida e por deixar meu almoço muito mais alegre! Douglas, obrigada também pelas risadas no almoço, pelas dicas e conselhos e por todas as conversas. Ste e Doug, o término desse ciclo foi decisivo com o apoio de vocês. Obrigada por toda a amizade e carinho. Obrigada Fara, “Farita”, minha companheira

de matérias, de seminários e conselheira de toda a vida! Nossas conversas foram uma válvula de escape para sair da rotina do trabalho. Ao Máximo, que já era companheiro desde o Bioprocessos I e, obviamente, não deixou de ser no Bioprocessos III. Obrigada pelas risadas e descontração que as vezes, o ambiente de trabalho necessita. E por levar aquela torta de limão incrível (agradeça a sua esposa, Nídia!). Obrigada a Dra. Viviane Maimoni Gonçalves, por todas as conversas no almoço e conselhos, e permitir minhas horinhas de “invasão” ao seu laboratório no horário de almoço, onde sempre me senti muito bem recebida e acolhida. Obrigada Rafaela, que não faz mais parte do Bioprocessos, porém a distância é só física! Você animou e continua me animando, mesmo tão longe. Por todas as cervejas para relaxar, saídas nos feriados por São Paulo e o pastel de camarão, que já virou tradição! Bioprocessos III, vocês estão no meu coração. Afinal, sempre fomos e seremos um só grupo! Obrigada a Mari e a Giovana, que integraram o grupo e fizeram parte dessa jornada, de aprendizado e amizade.

Aos meus amigos que não fazem mais parte do Bioprocessos I, Paola pelas barrinhas de cereias que salvavam no meio da tarde, me ajudar e me treinar na rotina dos experimentos desde meu projeto de PAP, e por todo o apoio, mesmo à distância. Esse trabalho não teria desenvolvido a metade sem você. Obrigada a Thiara, que até hoje não cumpriu a promessa de fazermos aulas de dança juntas, mas em compensação, além de parceira de trabalho, também virou minha companheira de vida. Obrigada pelos momentos de descontração nos fins de semana. Obrigada Felipe, mesmo com aquele humor ácido (fachada!), mas assim como a Paola, fez parte desse trabalho e sua ajuda foi crucial para a finalização. Obrigada pela paciência por me ensinar, dar dicas nos meus experimentos e por me treinar na rotina do laboratório. Saiba que você é importante e sua amizade não é esquecida.

Agradeço àqueles que são meu apoio e minha força não somente durante o tempo de elaboração desse trabalho, mas nos 28 anos da minha vida, meus pais Raimundo e Maria e minha irmã, Talita. Vocês sempre me apoiaram e continuam apoiando qualquer plano que eu resolva seguir. Seja escutando minha animação em conseguir um novo projeto, ao me escutarem quando estava passando por dificuldades e me aguentarem quando não estava no melhor humor! Por me impulsionarem e darem todo o aval para eu seguir em frente, mesmo não concordando, mas compreendendo e incentivando se eu decidir e me fizer feliz. Graças a vocês, sua filha/irmã é mestre! E isso não há palavras ou gestos que demonstrem a minha gratidão, com TUDO! Obrigada a minha tia, Sônia, que assim como meus pais, nunca duvidou da minha capacidade e do meu sucesso e sempre me impulsiona a seguir com o que eu sonhar para minha vida. Obrigada aos meus primos, Carlos e Jefferson, que sempre estão comigo em qualquer etapa da minha vida.

Aos amigos de longa data que eu compartilho a minha vida, Panmella, minha “gêmea”, a pessoa que mais me coloca para cima e acredita em mim, depois da minha família, e eu devo o maior apoio nesses 17 anos de amizade. Sem você, a minha maior força não existiria. Rafael, meu irmão já há 13 anos, obrigada por sempre estar por perto e fazer parte da minha vida, em todos os aspectos e dar aquele puxão de orelha quando necessário. Ao Gabriel, que além desses 7 anos de amizade, que começou ainda na graduação, foi meu parceiro de mestrado nesse mesmo programa. Obrigada aos intervalos, quando o trabalho permitia, as conversas no almoço e nossa amizade fora do ambiente acadêmico. Tudo foi muito melhor e mais fácil com você todos os dias. Grazielle, obrigada também por sua amizade desde a graduação e que continuou no PAP. Grazi, você foi meu apoio, e principalmente, nos momentos de descontração. Obrigada ao Filipo (Fifo), Francine, Simone, Ana Luiza, Andressa e Derek, por estarem do meu lado desde nossos tempos de Mackenzie. Laura e Daniel, o meu casal preferido e maior dupla que me apoiam! Obrigada por todos os Chagas bar no final de tarde, me receberem na casa de vocês com tanto amor e acreditarem em mim!

Ao Luciano, que também fez parte do Bioprocessos I, mas eu farei um agradecimento à parte, pois a nossa parceria de trabalho se estende muito mais do que uma rotina de trabalho compartilhada. Você não só me ajudou e fez parte efetiva desse trabalho, nem que fosse fazendo companhia durante os cultivos, como é meu irmão de coração. Obrigada por me receber na sua casa, compartilhar sua vida, dar conselhos, me colocar para frente, acreditar em mim e me impulsionar. Por todas as nossas conversas no Piratas pós trabalho e fins de semana durante sua estadia em São Paulo; por todas as risadas, conversas e conselhos via Skype, e nossa amizade não diminuiu em nada com sua vida de “quebecois”. Você sabe o quanto foi importante para eu completar esse mestrado e como continua a ser agora, com toda a força que me dá em cada plano meu de vida que compartilho com você.

Obrigada a Capes, ao BNDES e a Fundação Butantan, pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse concluído.

“The greatest enemy of knowledge is not ignorance; it is the illusion of knowledge”

Stephen Hawking

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente NOSSO. ”

Fernando Pessoa.

RESUMO

SANTOS, C. M. P. **Estudo dos diferentes aceptores de elétrons nos cultivos de *Haemophilus influenzae* tipo b em anaerobiose**. 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Haemophilus influenzae (Hi) é uma bactéria Gram negativa dependente dos fatores de crescimento NAD e hemina. *Haemophilus influenzae* sorotipo b (Hib) é causadora de doenças invasivas de importância clínica para saúde pública, como pneumonia e meningite, principalmente em crianças menores de 5 anos e idosos. É uma bactéria anaeróbia facultativa, permitindo-a se adaptar em diversos nichos do hospedeiro devido à versatilidade do seu arsenal metabólico e assim, ser capaz de causar infecção em nichos de maior disponibilidade de oxigênio (meninges e pulmões) assim como em nichos com sua limitação ou ainda na ausência completa (ouvido médio). O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento cinético de Hib em anaerobiose, aerobiose e a interface entre as duas condições, testando diferentes aceptores de elétrons (fumarato, DMSO, nitrato e oxigênio). Dentre eles o nitrato possui o maior potencial de redução padrão, porém o produto gerado desta reação no meio de cultura pode ter inviabilizado o crescimento celular. DMSO apresentou o maior crescimento celular em frascos agitados, com DO_{540nm} de 3,5 em meio complexo e DO_{540nm} de 1,7 em meio definido, frente ao fumarato de sódio, com DO_{540nm} de 2,72 em meio complexo e DO_{540nm} 1,5 em meio definido. Nos ensaios em biorreator foi observado que na condição de anaerobiose, na presença de fumarato de sódio como acceptor, succinato foi o metabólito principal formado (5,0 g/L). Acetato foi produzido em todos os ensaios testados, seja em anaerobiose ou aerobiose, porém é majoritário na condição de aerobiose (3,0 g/L). As fontes de carbono lactato de sódio e glicerol foram totalmente consumidas em aerobiose e lentamente em anaerobiose, sem que ocorresse o esgotamento. Mediante os aceptores de elétrons testados, DMSO e fumarato de sódio apresentaram crescimento celular similar, em anaerobiose, com DO_{540nm} ao redor de 1,50 e produção de polissacarídeo de 30 mg/L. Entretanto, *Haemophilus influenzae* sorotipo b (cepa GB3291) apresentou melhor crescimento celular, em aerobiose, tendo como acceptor final de elétron o oxigênio com DO_{540nm} ao redor de 5,0 e produção de polissacarídeo de 140 mg/L.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae* b. Anaerobiose. Aceptor de elétron. Metabolismo. Fumarato. DMSO.

ABSTRACT

SANTOS, C. M. P. **Study of different electron acceptor for *Haemophilus influenzae* type b in anaerobic cultivation.** 2016. 91 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Haemophilus influenzae (Hi) is a Gram negative bacterium depending on growth factors NAD and hemin. *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) causes invasive diseases such as pneumonia and meningitis, especially in children under 5 years and elderly, which is clinically important to public health. It is a facultative anaerobic bacterium, allowing it to adapt in different host niches due to the versatility of their metabolic arsenal and be able to cause infection in niches with more oxygen availability (meninges and lungs) as well as niche with its limitation or in the complete oxygen absence (middle ear). The aim of this work was to study the kinetic growth behavior of Hib anaerobically, aerobically and the interface between the both conditions, in the presence of different electron acceptors (fumarate, DMSO, nitrate and oxygen). Among these, nitrate has a higher standard reduction potential, but the product produced in this reaction in the medium could be unviable cell growth. DMSO showed the highest cell growth in bottle flasks, with DO_{540nm} of 3.5 in complex medium and in defined medium, DO_{540nm} of 1.7, compared to sodium fumarate, with DO_{540nm} of 2.72 in complex medium and in defined medium, 1.5. In bioreactor assays, in the anaerobic condition with the presence of sodium fumarate as acceptor, succinate was the major metabolite produced (5.0 g/L). Acetate was produced in all assays tested, either in aerobically or anaerobically conditions, but is majority in aerobiosis (3.0 g/L). The carbon sources sodium lactate and glycerol were completely consumed in aerobiosis and slowly consumed in anaerobiosis, without deplete completely in latter condition. About electron acceptors tested, DMSO and sodium fumarate showed similar cell growth in anaerobiosis, with DO_{540nm} around 1.50 and polysaccharide production of 30 mg/L. However, *Haemophilus influenzae* serotype b (strain GB3291) has better cell growth in aerobiosis, with oxygen as final electron acceptor with DO_{540nm} around 5.0 and polysaccharide production of 140 mg/L.

Keywords: *Haemophilus influenzae* b. Anaerobiosis. Electron acceptor. Metabolism. Fumarate. DMSO.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese da hemina	19
Figura 2 - Nichos de infecção causados por cepas não capsuladas e cepas capsuladas de <i>Haemophilus influenzae</i>	21
Figura 3 - Mecanismo de interação e adesão à célula do hospedeiro pelo pili.....	23
Figura 4 - Mecanismos das proteínas autotransportadoras no estabelecimento da infecção	26
Figura 5 - Estrutura do LPS.....	26
Figura 6 - Estrutura da cápsula polissacarídica dos diferentes sorotipos de <i>Haemophilus influenzae</i>	27
<u>Figura 7- Loci das cápsulas de <i>Haemophilus influenzae</i> sorotipos a – f.....</u>	<u>28</u>
Figura 8 - Estrutura da menaquinona e ubiquinona.....	32
Figura 9 - Estrutura dos citocromos presentes em bactérias.....	33
Figura 10 - Via de degradação de carboidratos de Hi.....	34
Figura 11 - Preparo do pré inóculo e inóculo.....	39
Figura 12 - Ensaios em frascos agitados com diferentes fontes de carbono e suas combinações.....	40
Figura 13 - Ensaio em biorreator de Hib em anaerobiose.....	41
Figura 14 - Ensaio em biorreator de Hib em aerobiose.....	42
Figura 15 - Ensaios em biorreator em diferentes condições de cultivo.....	43
Figura 16 - Cultivo de Hib em anaerobiose utilizando meio complexo MMP.....	46
Figura 17 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em presença de nitrato de sódio, DMSO e da mistura DMSO + nitrato de sódio.....	47
Figura 18 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em presença de nitrato de sódio, fumarato de sódio e a mistura da fumarato de sódio e nitrato de sódio.....	48
Figura 19 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em presença de DMSO, fumarato de sódio e da mistura fumarato de sódio e DMSO.....	49
Figura 20 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib na presença de nitrato de sódio, DMSO, fumarato de sódio utilizando o meio MD.....	50
Figura 21 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib, em meio MD, na presença de diferentes concentrações de fumarato de sódio.....	51
Figura 22 - Cultura de Hib na presença de nitrato de sódio em MD e MMP.....	52
Figura 23 - Cultivos de Hib em diferentes combinações de fontes de carbono.....	53
Figura 24 - Cinética de produção de ácidos e consumo de fumarato de sódio em diferentes fontes carbono.....	56
Figura 25 - Gliconeogênese em célula bacteriana na presença de lactato.....	58
Figura 26 - Mecanismo de formação de ácido siálico através do lactato.....	59
Figura 27 - Via de entrada de glicerol na célula bacteriana.....	60
Figura 28 - Via de entrada de glicose na célula bacteriana.....	61
Figura 29 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib na presença DMSO em diferentes maneiras de manter a atmosfera inerte.....	63

Figura 30 – Cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP, e consumo da fonte de carbono na presença de DMSO como aceptor de elétron.....	63
Figura 31 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib na presença de fumarato de sódio em diferentes maneiras para manter a atmosfera inerte.	64
Figura 32 - Consumo das fontes de carbono por Hib, com fumarato de sódio como aceptor de elétrons.	65
Figura 33 - Cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP por Hib, com fumarato de sódio como aceptor de elétrons..	65
Figura 34 - Cinética de crescimento de Hib em aerobiose (controle).....	67
Figura 35 - Cinética de consumo de substratos, produção de ácidos orgânicos e PRP por Hib em anaerobiose.....	68
Figura 36 - Cinética de crescimento de Hib com transição de aerobiose para anaerobiose.....	69
Figura 37 - Perfil cinético de consumo de substrato, produção de ácidos orgânicos e PRP (transição de aerobiose para anaerobiose).....	70
Figura 38 - Perfil cinético de crescimento de Hib em biorreator após troca gradual de oxigênio para nitrogênio.	71
Figura 39 - Perfil da cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP, e consumo de fumarato de sódio	72
<u>Figura 40 - Consumo de substratos após troca gradual de oxigênio para nitrogênio.</u>	<u>72</u>
Figura 41 - Cinética de crescimento de Hib em aerobiose em presença de fumarato de sódio	73
Figura 42- Cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP, e consumo de fumarato de sódio por Hib após cultivo em aerobiose na presença de fumarato de sódio.....	75
Figura 43 - Consumo de lactato de sódio e glicerol por Hib após cultivo em aerobiose na presença de fumarato de sódio.	75
Figura 44 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em diferentes condições de aeração.....	76
Figura 45 - Mecanismo de redução de fumarato a succinato na cadeia de transporte de elétrons	79
Figura 46 - Representação das enzimas DMSO redutase na membrana plasmática.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio MMP	36
Tabela 2 - Composição do meio MD	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA: ácido δ -aminolevunílico
ArcA/B: *Anoxic Redox Control*
BHI: *Brain Heart Infusion*
C.T.e: cadeia de transporte de elétrons
DHA: diidroxicetona
DHAP: diidroxicetona fosfato
DMSO: dimetilsulfóxido
DMS: dimetilsulfeto
Dps: *DNA-binding Proteins from Starved cells*
DO_{540nm}: densidade óptica em 540nm
EMP: Embden-Meyerhof-Parnas
FAD: flavina adenina dinucleotídeo
FNR: *Fumarate Nitrate Reductase*
G6P: glicose-6-fosfato
G3P: glicerol-3-fosfato
Hap: *Haemophilus* adhesion and penetration protein
HbPV – *Haemophilus b* Polysaccharide Vaccine
Hia: *Haemophilus influenzae* adhesion
Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b
Hi: *Haemophilus influenzae*
Hsf: *Haemophilus surface fibrils*
HMW: *High Molecular Weight proteins*
IgA: imunoglobulina tipo A
IgA1: imunoglobulina tipo A – classe 1
IgA2: imunoglobulina tipo A – classe 2
IgD: imunoglobulina tipo D
IgG: imunoglobulina tipo G
LPS: lipopolissacarídeo
LOS: lipooligossacarídeo
MEC: matrix extracelular

MHC: complexo de histocompatibilidade
MMP: *Modified medium peptone*
MD: meio quimicamente definido
NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NTHi: *Haemophilus influenzae* não capsulado
PEP: fosfoenolpiruvato
PBG: porfobilinogênio
PD: piruvato desidrogenase
PFL: piruvato formiato liase
PPP: *Phosphate Pentoses Pathway*
PRP: poli - ribosil-ribitol-fosfato
PTS system: *phosphotransferase system*
SLPI: *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*
TMAO: óxido de trimetilamina
TMA: trimetilamina
TCA: ciclo do ácido tricarbóxico
UA: unidade de absorvância.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	17
2.1 <i>Objetivo geral</i>	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 <i>O microrganismo</i>	18
3.2 <i>Patogenicidade</i>	20
3.2.1 <u>Pili</u>	22
3.2.2 <u>Proteínas autotransportadoras</u>	23
3.2.2.1 IgA1 protease	23
3.2.2.1 Hap	24
3.2.2.2 Hia e Hsf	24
3.2.3 <u>Lipopolissacarídeo (LPS)</u>	26
3.2.4 <u>Cápsula polissacarídica</u>	26
3.3 <i>Vacina</i>	28
3.4 <i>Metabolismo</i>	30
3.5 <i>Regulação da respiração</i>	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 <i>Preparação para os experimentos</i>	36
4.1.2 <u>Microrganismo</u>	36
4.1.3 <u>Meio de cultura</u>	36
4.1.3.1 Meio MP Modificado (MMP)	36
4.1.3.2 Meio quimicamente definido (MD)	37
4.1.3.3 Preparo da solução de aceptores	39
4.2 <i>Experimentos</i>	39
4.2.2 <u>Pré inóculo e inóculo</u>	39
4.2.3 <u>Ensaio em frascos agitados</u>	40
4.2.3.1 Meio MD com diferentes fontes de carbono	40
4.3.4 <u>Ensaio em biorreator</u>	41
4.3.5 <u>Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos</u>	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 <i>Cultivos em frascos agitados</i>	45
5.1.2 <u>Cultivo de Hib no meio MMP em presença de diferentes aceptores</u>	46
5.1.3 <u>Cultivo de Hib no meio definido em presença de diferentes aceptores</u>	49
5.1.3.1 Cultivo em frascos agitados com diferentes fontes de carbono	53
5.2 <i>Cultivos em biorreator</i>	62
5.2.2 <u>DMSO como acceptor de elétrons em anaerobiose</u>	62
5.2.3 <u>Fumarato de sódio como acceptor de elétrons em anaerobiose</u>	64
5.2.3.1 Fumarato de sódio como acceptor de elétrons em diferentes condições de aeração	66
6 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Haemophilus influenzae (Hi) é uma bactéria Gram negativa, fastidiosa e dependente de fatores de crescimento (NAD e hemina). É dividida em dois grupos, os acapsulados (não tipáveis) e os capsulados (tipáveis), sendo esse último grupo subdividido em sorotipos de acordo com as características químicas da cápsula polissacarídica, classificados de a-f. O Hi sorotipo b (Hib) é o principal agente etiológico entre as cepas capsuladas, causando manifestações clínicas invasivas como pneumonia e meningite. Dessa forma, é uma causa importante de mortalidade, principalmente em crianças abaixo de 5 anos, idosos e imunodeficientes, principal grupo de risco para desenvolvimento de doenças invasivas e sendo, portanto, de grande importância na saúde pública (KILIAN, 1976; PITTMAN, 1931)

Hib é um patógeno exclusivamente humano, anaeróbico facultativo no qual consegue se adaptar em condições ambientais distintas, pois possui um arsenal metabólico estruturado para se instalar nesses nichos. No hospedeiro, a porta de entrada para o início da infecção se faz pela nasofaringe, através de fatores de virulência como pili e proteínas autotransportadoras (garantem aderência às mucosas da nasofaringe), lipopolissacarídeo e a cápsula polissacarídica (auxiliam na proteção da bactéria contra o sistema imune quando está na corrente sanguínea, principalmente) e garantem o sucesso para que o Hi se instale em diversos nichos do hospedeiro, desde aqueles altamente oxigenados a outros com sua limitação (CHRISTOPH; HOOD; MOXON, 2001; WONG; AKERLEY; 2012). Essa adaptação, entre outros fatores, atribui-se ao fato do Hi possuir uma cadeia de transporte de elétrons (C.T.e.) versátil, no qual é permitido o uso de diferentes compostos comoceptor final de elétrons além do oxigênio, entre eles o nitrato, o fumarato, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o óxido de trimetilamina (TMAO), que foram demonstrados em modelos *in silico*, a existência de *operons* responsáveis pela expressão de enzimas redutases necessárias para utilização desses compostos por Hi (RAGHUNATHAN et al., 2004). Além disso, a regulação das vias metabólicas para adaptação em diferentes níveis de oxigênio ocorre por sistemas conhecidos como o *Anoxic redox control A e B* (ArcA/B) e o *Fumarate Nitrate Reductase* (FNR), que de acordo com a disponibilidade ou não de oxigênio, modulam vários mecanismos no metabolismo da bactéria, como catabolismo de carboidratos e expressão de enzimas necessárias para sua sobrevivência em ambientes muito distintos e com limitada

disponibilidade de nutrientes (GUNSALUS; PARK, 1994). A vacina conjugada contra Hib foi um importante passo para a diminuição de casos de infecções por esta bactéria, sendo introduzida pela primeira vez nos Estados Unidos em 1985. Como antígeno vacinal é usado o polissacarídeo capsular conjugado covalentemente a uma proteína carreadora (toxóide tetânico), garantindo a imunogenicidade do polissacarídeo, em crianças menores de 5 anos (DOMINGUEZ et al., 2003).

Com a introdução da vacina contra Hib, reduziu-se consideravelmente os casos de meningite mundial. Porém, ainda apresenta taxas de morbimortalidade nos grupos de risco e devido às complicações provocadas, ainda continua sendo a causa de óbitos nos países em desenvolvimento nos quais a vacina não é amplamente distribuída (DOMINGUEZ et al., 2003).

A produção da vacina conjugada de Hib está sendo estudada no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, laboratório responsável por desenvolver processos de produção e de purificação de antígenos vacinais baseados em tecnologias inovadoras. Dentro deste contexto, são realizados estudos direcionados a produção do polissacarídeo capsular; avaliação da estabilidade do polissacarídeo durante o cultivo para melhorar o rendimento; é também realizado o estabelecimento do meio quimicamente definido para estudar o metabolismo deste microrganismo e facilitar no processo de purificação do polissacarídeo e conseqüentemente no processo de conjugação, além da otimização das etapas do processo de purificação do polissacarídeo (ALBANI et al., 2014; BRAGA et al., 2015; CINTRA, 2014; RIBEIRO; SILVA, 2010; TAKAGI, et al, 2006; TAKAGI et al., 2007; WILWERT et al., 2011).

O trabalho aqui apresentado é dedicado ao estudo do crescimento de Hib em anaerobiose com diferentes aceptores de elétrons e em diferentes níveis de oxigenação. Os resultados alcançados e discutidos pretendem contribuir para a compreensão do metabolismo deste microrganismo na transição entre crescimento aeróbio e anaeróbio no qual a bactéria é capaz de realizar quando realiza a infecção ao hospedeiro.

2 OBJETIVO

2.1 *Objetivo geral*

- Estudar o metabolismo de Hib em anaerobiose e aerobiose.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar o crescimento de Hib em presença de diferentes aceptores de elétrons, em condições de anaerobiose e aerobiose.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O microrganismo

Haemophilus influenzae (Hi) é uma bactéria pertencente à família *Pasteurellaceae* caracterizado como coco bacilar, Gram negativa, não esporulado e comumente encontrado na nasofaringe humana (WINSLOW et al., 1920). É dependente dos fatores de crescimento – fator V (NAD) e fator X (hemina). O NAD é importante em reações de óxido-redução, além de ser uma das coenzimas necessárias para as reações metabólicas. O metabolismo vestigial existente de NAD no Hi consiste em um sistema com baixa atividade de sintetize, portanto, necessita ser captado do meio extracelular (GERLACH; REIDL, 2006; KILIAN, 1976). Hi, um microrganismo comensal do trato respiratório superior, que esse nicho propicia um ambiente microaerofílico, apresenta seu metabolismo direcionado às vias redutivas do que oxidativas (RAGHUNATHAN et al., 2004). Hemina é sintetizada através do ácido δ -aminolevunílico (ALA), formado a partir do α -cetoglutarato ou succinato, e da glicina em um dos ramos do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Como ilustra a Figura 1, ALA é condensado para formar anel pirrólico, porfobilinogênio (PBG) e este, é condensado para formar o uroporfirinogênio III, que por sua vez é reduzido à hexahidroporfirina. O produto dessa redução é sucessivamente descarboxilado a coproporfirinogênio. Dois ácidos propiônicos provenientes do uroporfirinogênio III são descarboxilados para formar a protoporfirinogênio, então oxidado e quelado ao ferro para formar assim a hemina, que sofrerá modificações para formação dos citocromos. Entretanto, Hi não possui o arsenal enzimático para a rota de formação de hemina, uma vez que não possui as enzimas para formar PBG a partir do ALA; uroporfirinogênio III a partir do PBG e coproporfirinogênio a partir do uroporfirinogênio III, necessitando assim de fonte exógena para o seu crescimento (WHITE; GRANICK, 1963).

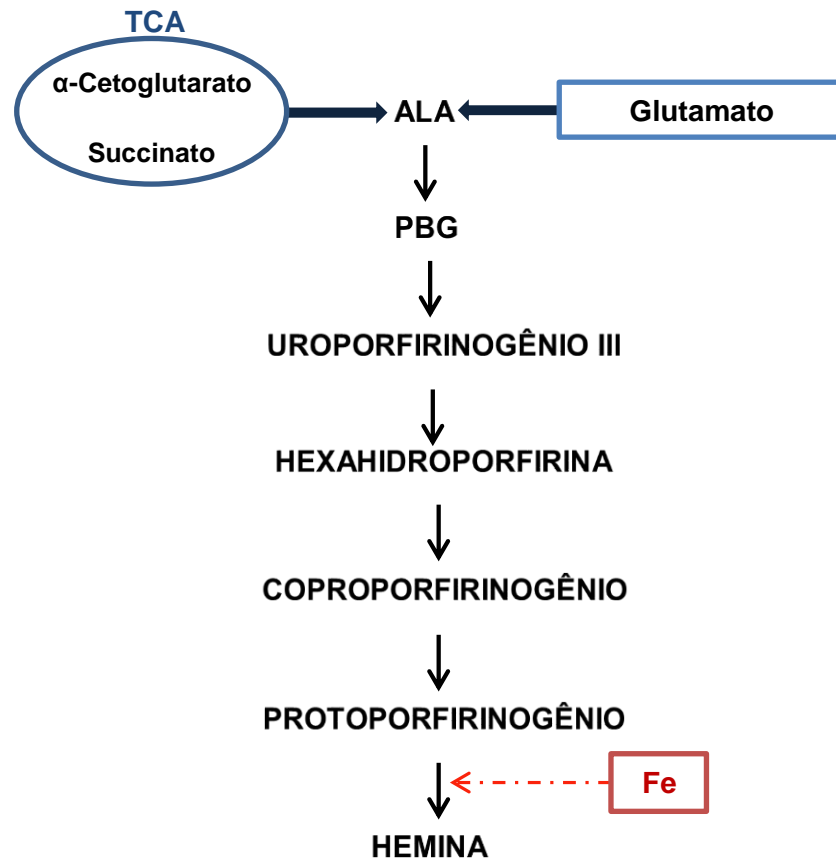


Figura 1 - Síntese da hemina

(Extraído de WHITE; GRANICK, 1963)

Hi é dividido em dois grupos, aqueles que não possuem cápsula (não tipáveis), causadores de doenças não invasivas como otite média, e os capsulados (tipáveis) subdivididos em sorotipos de a-f (KILIAN, 1976; PITTMAN, 1931). O Hi sorotipo b (Hib) é o de maior importância clínica e está relacionado principalmente as manifestações de pneumonia e meningite, entre outras infecções como epiglote, celulite, artrite séptica e infecções de tecidos moles e ossos (WATT et al., 2009). Meningite é a manifestação clínica invasiva mais comum e grave causada por Hib e na era pré-vacina, correspondia de 50% a 60% dos casos de meningite. Problemas auditivos e outras sequelas neurológicas ocorriam de 15% a 30% dos sobreviventes e casos fatais entre 3% a 6%, mesmo quando o paciente estava sob antibioticoterapia adequada (HAMBORSKY; KROEGER; WOLFE, 2015).

3.2 Patogenicidade

Na era pós-vacinação, de 0,5% a 3% dos recém-nascidos e crianças menores de 5 anos apresentaram Hib nos isolados da nasofaringe como microbiota, porém, somente em alguns indivíduos o microrganismo chegava a causar doenças invasivas. O modo exato de como é feita a transição para a corrente sanguínea não é totalmente entendida, porém, a infecção no trato respiratório superior é um fator inicial determinante uma vez que esta é a porta de entrada do microrganismo no hospedeiro. Dessa forma, a habilidade do patógeno em se ligar as mucosas ou a matriz extracelular (MEC), responsável pelo preenchimento do espaço entre as células dos tecidos e constituída de variadas proteínas e polissacarídeos secretados pelas células, é essencial para permitir a multiplicação do mesmo nesse nicho (FOXWELL; KYD; CRIPPS, 1998). Esse tipo de interação microrganismo-hospedeiro é dependente de receptores presentes nas células bacterianas através de seus ligantes específicos; do microambiente e de outros microrganismos nos quais colonizam essa área em particular. No caso das cepas não capsuladas (NTHi), 80% é comumente encontrada na nasofaringe colonizando-a. Entretanto, a habilidade de invadir outros tipos de tecidos e desenvolver a infecção, é dependente da imunidade do hospedeiro (AGRAWAL; MURPHY, 2011). O epitélio ciliado das vias aéreas, assim como dos seios paranasais e o ouvido médio, são as regiões usuais de infecção por Hi e onde são observados a produção de muco. A Figura 2 ilustra os principais nichos de infecção no hospedeiro causado por Hi e NTHi.

De acordo com estudo realizado por Kubiet et al. (1995), comparando parâmetros de adesão de cepas NTHi, de isolados respiratórios e sanguíneos na mucina e na lactoferrina, respectivamente, a camada de muco presente nas mucosas foi de grande importância para o início da infecção no trato respiratório superior. Da mesma forma foi observado no trato respiratório inferior, no qual a ligação do Hi com o muco é essencial para o início da colonização nas células pulmonares do hospedeiro (KUBIET, 1995; READ et al., 1991). A mucina é uma glicoproteína produzida pelo muco, secretado pelas células epiteliais ou pelas glândulas da submucosa, e responsável pela viscosidade do muco. Kubiet observou ainda que a adesão de bactérias à lactoferrina tem como objetivo obtenção de ferro, uma vez que as vias aéreas, assim como o plasma, são pobres nesse mineral. A lactoferrina é uma glicoproteína ligante de ferro presente no leite humano e de alguns mamíferos, e em

menor concentração, em fluídos exócrinos como a bile e nas lágrimas. Por sua capacidade de ligar-se ao ferro, está associada à absorção de ferro pela mucosa intestinal e dessa forma, age como bacteriostático por reter ferro circulante e impedir seu uso por bactérias patogênicas (LÖNNERDAL; IYER, 1995).

Além disso, a lactoferrina possui a capacidade de se ligar a porção do lipídio A na estrutura do lipopolissacarídeo (LPS), resultando na perda da integridade da membrana externa da bactéria, levando-a a morte. Portanto, a ligação da bactéria com a lactoferrina seria também um mecanismo de defesa para o patógeno (ELLISON; GIEHL; LAFORCE, 1988). Kubiet também observou que durante o processo de invasão à corrente sanguínea ocorre *down-regulation* na capacidade de ligação entre a bactéria e o muco do hospedeiro e *up-regulation* na ligação do microrganismo com a lactoferrina, sugerindo um mecanismo de escape das defesas presentes no trato respiratório e princípio da bacteremia, favorecido pela disponibilidade de nutrientes presentes na corrente sanguínea (KUBIET, 1995).

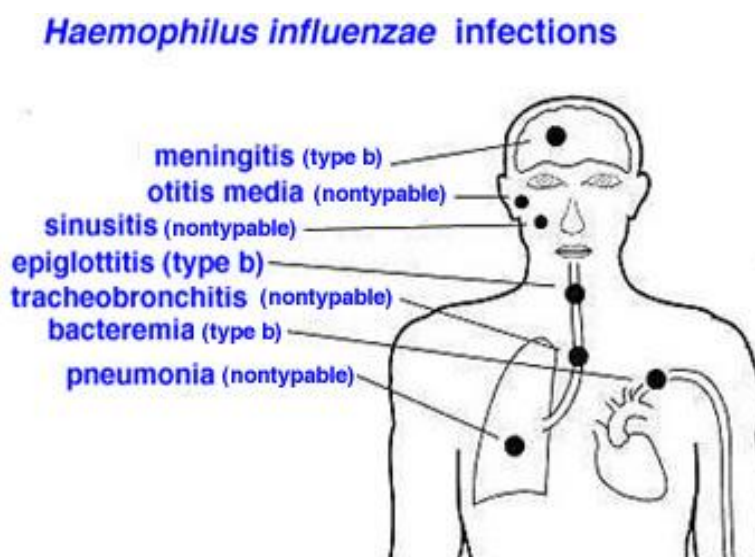


Figura 2 - Nichos de infecção causados por cepas não capsuladas e capsuladas de *Haemophilus influenzae*.

(Extraído de Online Textbook of Bacteriology - http://textbookofbacteriology.net/haemophilus_2.html).

A cepa encapsulada de Hib é uma importante causa de manifestações clínicas como bacteremia, meningite, epiglotite, ilustradas na figura 2, responsável por

doenças sistêmicas no hospedeiro (SUKUPOLVI-PETTY; GRASS; ST GEME, 2006). Ao atingir a corrente sanguínea, Hib pode espalhar-se para qualquer nicho do indivíduo. Existem duas hipóteses de invasão demonstradas por Rubin e Moxon (1983): (1) Hib consegue atravessar a mucosa nasofaríngea para atingir a corrente sanguínea diretamente através do epitélio dos vasos sanguíneos ali presentes, no qual algumas células bacterianas conseguem resistir ao ataque das defesas do retículo endotelial presente na submucosa do epitélio desses vasos e assim, suportam a bacteremia, ou (2) a bactéria pode ser transportada aos linfonodos, no qual algumas células conseguem sobreviver, multiplicar e assim, resultar na bacteremia através da sua entrada à corrente sanguínea via vasos linfáticos (RUBIN; MOXON, 1983).

Outra possível porta de entrada da bactéria na corrente sanguínea seja através da fagocitose do microrganismo por leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, no qual algumas células bacterianas conseguem resistir a esse mecanismo de defesa do hospedeiro. Adesão às células do hospedeiro, como neutrófilos e/ou eritrócitos, também está ligado ao sucesso de Hib em conseguir passagem até a corrente sanguínea. Outra possibilidade é quando há lesão na mucosa do hospedeiro, causada pela forte reação inflamatória em resposta à presença do patógeno e, através da área lesionada, Hib encontra uma passagem à corrente sanguínea, utilizando os capilares sanguíneos expostos (JACOBS et al., 1982).

Para garantir a invasão e, conseqüentemente, o desenvolvimento da patogenia, as bactérias contam com fatores de virulência específicos que medeiam à interação com o hospedeiro. Esses fatores oferecem importantes mecanismos de resistência contra as defesas do hospedeiro, invasão aos tecidos e produção de toxinas necessárias para sua própria defesa e passagem as células do hospedeiro. A seguir serão apresentados os principais fatores de virulência ligados ao Hi.

3.2.1 Pili

Como a maioria das bactérias Gram negativas, Hi é capaz de sintetizar pili, uma adesina formada por estruturas poliméricas helicoidais, dispostas circunferencialmente e que medeiam a ligação com eritrócitos, causando hemaglutinação, além de garantir aderência com as células epiteliais orofaríngeas, tecido nasal (ALPHEN, VAN et al., 1991; CHRISTOPH; HOOD; MOXON, 2001) e muco respiratório (KUBIET et al., 2000). A presença de pili propicia que ocorra o

estabelecimento da infecção, é o primeiro contato do patógeno com a camada de muco produzido pelas células epiteliais do hospedeiro e, além disso, um pré-requisito para o início da invasão. Uma vez realizado o contato inicial, o microrganismo adere-se as células epiteliais, como ilustra a Figura 3, para escapar de mecanismos de remoção do hospedeiro, como ação mucociliar e produção de secreções (TRABULSI, 2008).

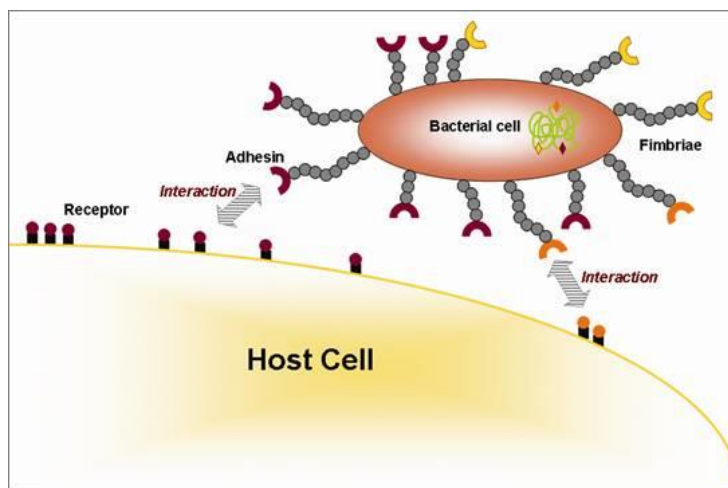


Figura 3- Mecanismo de interação e adesão à célula do hospedeiro pelo pili (ANTÃO, 2002).

3.2.2 Proteínas autotransportadoras

As proteínas autotransportadoras são compostas por uma ampla família com mais de 700 membros e fazem parte da maior família de proteínas extracelular de bactérias Gram negativas (COTTER; SURANA; ST GEME, 2005). Encontram-se inseridas na membrana externa da célula bacteriana e apresentam uma variedade de funções como aderência, auxílio na invasão à célula hospedeira, na atividade proteolítica e na citotoxicidade (HENDERSON; NATARO, 2001). Em *Hi*, destacam-se as IgA1 protease, Hap (*Haemophilus adhesin and penetration protein*), Hia (*Haemophilus influenzae adhesin*) e Hsf (*Haemophilus surface fibrils*) entre outras proteínas dessa família como será abordado a seguir.

3.2.2.1 *IgA1 protease*

Pertence à família de enzimas bacterianas que clivam especificamente a imunoglobulina A1 (IgA1) humana na região *hinge* (região de flexibilidade entre as cadeias Fab e Fc das imunoglobulinas IgA, IgG e IgD), uma vez que o isotipo IgA2 não contém a região *hinge* (PLAUT, 1983). A IgA possui importante papel nas mucosas através da aglutinação de bactérias invasoras e dessa forma, inibe a interação do patógeno com a superfície epitelial, além de se ligar as enzimas e toxinas bacterianas neutralizando-as (MUSSER et al., 1986). Quando a IgA é clivada, ela é eliminada e facilita a colonização pelas bactérias patogênicas presentes no hospedeiro (KILIAN et al., 1979). Inúmeros organismos patogênicos possuem esse tipo de protease que é capaz de clivar a IgA em diferentes sítios das ligações peptídicas presente na região *hinge*, como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus sanguinis* (PLAUT, 1983).

3.2.2.1 *Hap*

É um autotransportador monomérico de 155 kDa sendo identificado inicialmente em uma cepa de isolado clínico (*Haemophilus influenzae* N187) no qual foi observado a aderência dessa proteína às células epiteliais do sistema respiratório (ST GEME et al., 1993). Apresenta homologia significativa com as IgA proteases (35% de identificação) e possui um sítio catalítico formado por serina-protease. Assim como a IgA protease, a maior parte da Hap é clivada e lançada para a superfície da célula bacteriana, e são comumente relacionadas às cepas capsuladas (HENDERSON; NATARO, 2001). Garante aderência do microrganismo às células epiteliais e nas proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, como a fibronectina, laminina e o colágeno tipo IV para a invasão (FINK et al., 2002), além de facilitar a agregação e formação de microcolônias, possivelmente intermediada pela formação de biofilmes (HENDRIXSON; ST GEME, 1998).

3.2.2.2 *Hia e Hsf*

São proteínas autotransportadoras com função de aderência às células epiteliais do sistema respiratório. Apresentam conformação triméricas que apresentam homologia significativa predominantemente na porção N- e C-terminal (72% de identificação) (HENDRIXSON; ST GEME, 1998). A expressão de Hsf foi observada principalmente em cepas capsuladas do tipo b, enquanto Hia em cepas não capsuladas, sendo expressa quando há deficiência na produção de proteínas de alto peso molecular (HMW – *High Molecular Weight proteins*) pelas cepas não capsuladas (HENDERSON; NATARO, 2001). As HMW são proteínas da membrana externa encontradas em cepas NTHi e sua estrutura possui grau de “parentesco” com os filamentos de hemaglutinina encontrada na *Bordetella pertussis*, uma glicoproteína de membrana que garante aderência da bactéria. Assim como na *B. pertussis*, as HMW conferem aderência para as NTHi em células epiteliais de mucosas (TUOMANEN, 1986; ST GEME et al., 1993).

O mecanismo de atuação das autotransportadoras é realizado conjuntamente para estabelecer a infecção, conforme ilustra a Figura 4. Inicialmente, as proteínas Hap e Hia facilitam o microrganismo na adesão às células epiteliais e a Hap ainda promove a aderência à matriz extracelular nas camadas de epitélio danificado. A atividade autoproteolítica da Hap é interrompida pelo inibidor de protease secretada por leucócitos (SLPI - *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*), resultando na retenção do Hap na superfície da bactéria. A IgA1 protease é liberada da superfície bacteriana e cliva a IgA1 do hospedeiro (a). Uma vez que a bactéria está aderida ao epitélio, a interação entre as Haps leva a formação de microcolônias (b) e esta, na formação de um biofilme resistente aos mecanismos imune do hospedeiro (c). Na ausência de SLPI, a atividade autoproteolítica da Hap permite que algumas bactérias se dispersem até atingir novos sítios de infecção (d). A adesão mediada pela Hap promove a invasão bacteriana em outras células epiteliais (SPAHICH; ST. GEME, 2011).

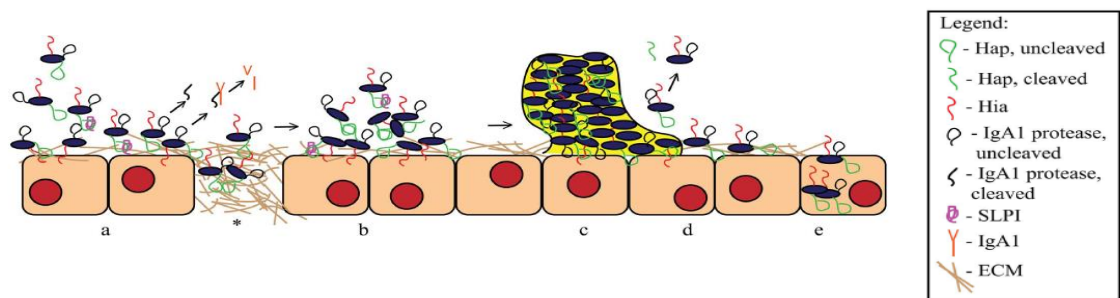


Figura 4- Mecanismos das proteínas autotransportadoras no estabelecimento da infecção (SPAICH, *et al.* 2011).

3.2.3 Lipopolissacarídeo (LPS)

LPS é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram negativas, formada pelo lipídio A (parte hidrofóbica e principal responsável pela patogenicidade), ligada covalentemente a um oligossacarídeo (açúcar que interage especificamente com as células do hospedeiro) e ao antígeno O (parte polissacarídica do LPS) (CHRISTOPH *et al.*, 2001) (Figura 5). No caso do Hi, a parte polissacarídica é inexistente, caracterizando o LPS como lipooligossacarídeo (LOS) e garantindo a sobrevivência do microrganismo contra o sistema complemento quando ele se encontra nas mucosas e na corrente sanguínea (QUINN *et al.*, 1977; MAGALHÃES *et al.*, 2007).

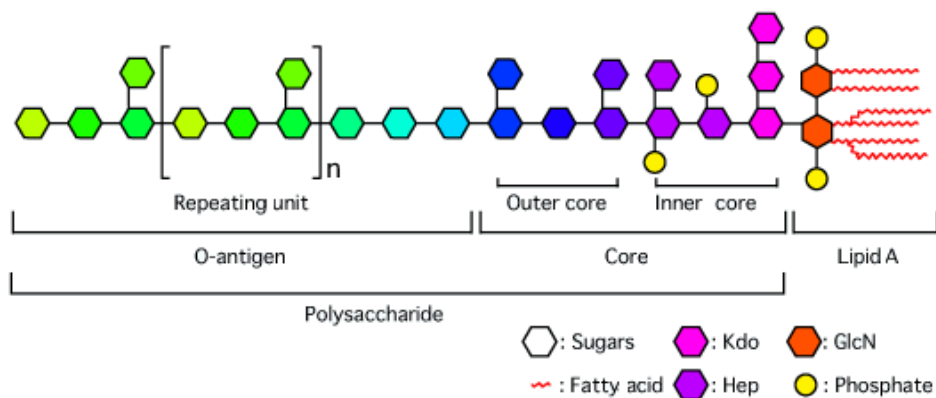


Figura 5- Estrutura do LPS

(ULMER *et al.*, 1989).

3.2.4 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é um importante componente da virulência de patógenos para garantir a resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que ao atravessar à barreira da mucosa e entrar na corrente sanguínea, a cápsula inibe a fagocitose pelos neutrófilos e protege o patógeno contra a clássica via bactericida mediada pelo sistema complemento, facilitando a replicação intravascular do microrganismo. (TUNKEL; SCHELD, 1993). *Hi* pode expressar seis tipos de cápsulas diferentes, distintas por especificidades químicas e antigênicas associadas a elas, identificadas sorotipicamente de a-f como ilustrado na Figura 6 (PITTMAN, 1931). As cápsulas dos sorotipos a e b diferem dos tipos c-f, por uma pentose, o ribitol. A cápsula do sorotipo b é formada por polímeros de poli-ribosil-ribitol-fosfato (PRP).

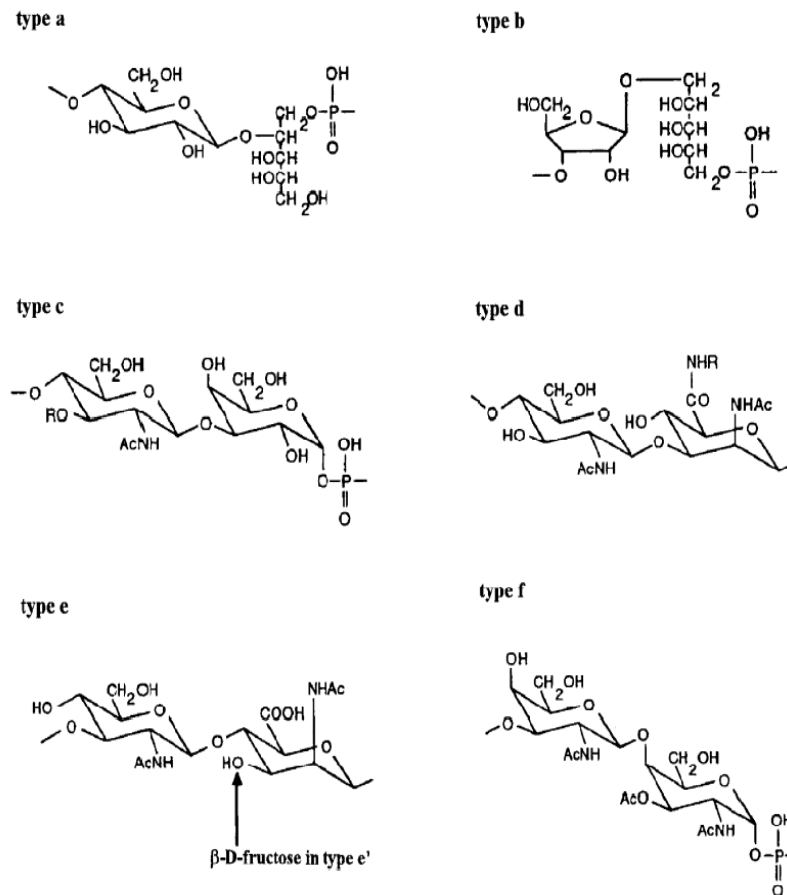


Figura 6 - Estrutura da cápsula polissacarídica dos diferentes sorotipos de *Haemophilus influenzae*

(PITTMAN, 1931).

A região do cromossomo no qual ocorre a expressão da capsula é denominada *locus cap*, dividida em três regiões distintas baseadas em suas funções como ilustrado na Figura 7 (SATOLA et al., 2003). Genes pertencentes a região 1 (*bex* A, B, C, D) e região 3 (*hcs* A, B) são necessários para o processamento e transporte da cápsula para fora da célula e comum para todos os sorotipos, e a região 2 (genes *bcs* 1, 2, 3, 4) está envolvida na biossíntese da cápsula, sendo específica a cada sorotipo.

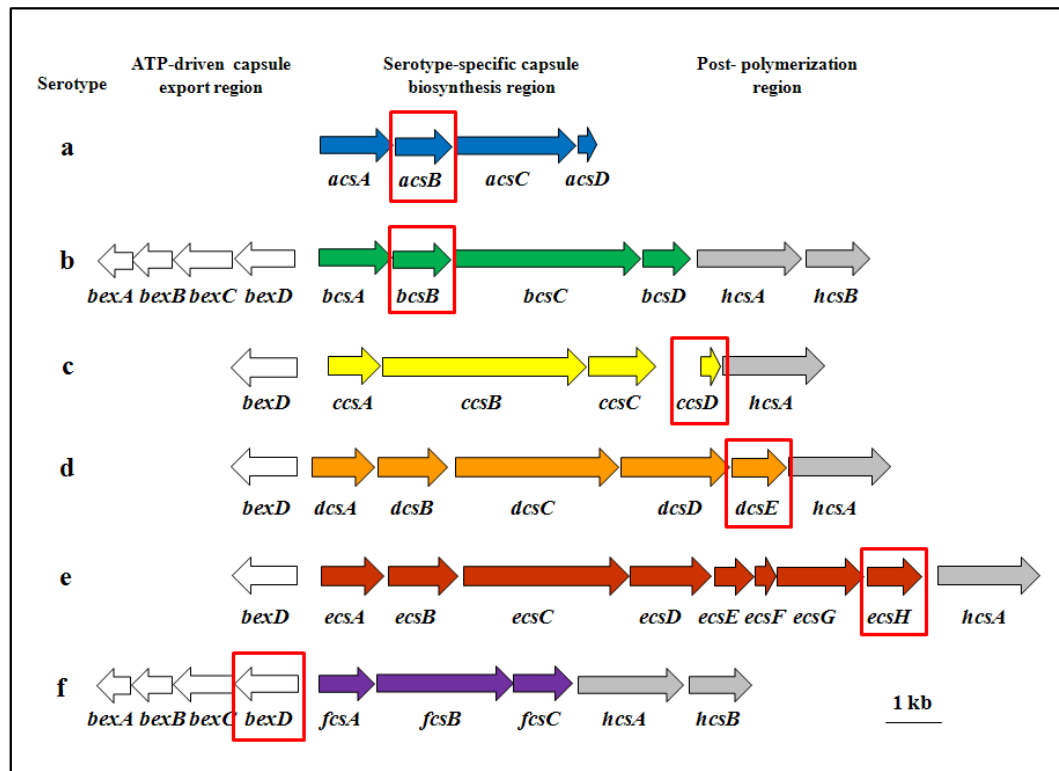


Figura 7- Loci das cápsulas de *Haemophilus influenzae* sorotipos a – f

Setas brancas (*bex*DCBA) e setas cinzas (*hcs*) representam as regiões 1 e 3, respectivamente, no qual são responsáveis pela modificação pós polimerização e exportação da cápsula. Setas coloridas representam a região 2 sorotipo-específica e os genes são denominados de acordo com o sorotipo (Hia – *acs*, Hib – *bcs*, etc). Genes destacados por borda vermelha representam os genes detectados nos ensaios de PCR em tempo real para determinação dos sorotipos. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2012).

3.3 Vacina

Antes da vacinação, nos Estados Unidos, a meningite causada por esse patógeno era a principal ocorrência entre as meningites bacterianas e o Hib o principal agente etiológico responsável por essa e outras doenças invasivas. Nos países

desenvolvidos a incidência de meningite, em geral, era de 15 a 60 casos por 100 mil habitantes em menores de 5 anos de idade (DOMINGUEZ; DAUM, 2003).

A primeira vacina denominada de *Haemophilus b polysaccharide vaccine* (HbPV) foi licenciada nos Estados Unidos em 1985 e era constituída de polissacarídeo purificado (ANDERSON et al., 1972; HARRISON; BROOME; HIGHTOWER, 1989; WARD et al., 1988).

Em crianças menores de 18 meses, a principal faixa de risco, foi observada que a HbPV não induzia uma resposta imune adequada contra o Hib, sendo efetiva em crianças na faixa etária de 18 e 24 meses que correspondia a apenas 25% da ocorrência de meningite por Hib (WARD et al., 1988). Esse fato pode ser explicado devido ao polissacarídeo ser um antígeno do tipo T-independente e sendo assim, não é apresentado as células do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II, ocasionando na falta de produção de células de memória pelas células B. Portanto, a falta de interação das células T com o sistema imune limita a imunogenicidade do polissacarídeo como antígeno vacinal e como consequência, após a vacinação, crianças até 2 anos rapidamente possuem uma diminuição na concentração de anticorpos no soro contra Hib (MOND et al., 1995; FAIRHURST et al., 1998). Para o aumento da imunogenicidade, o polissacarídeo de Hib (PRP) é conjugado covalentemente a uma proteína carreadora e assim, o polissacarídeo conjugado torna-se um antígeno célula T-dependente, com indução de células de memória produzidas pelas células B (ANDERSON, 1983; GRANOFF; BOIES; MUNSON, 1984). Em 1987 foi introduzida a vacina de PRP conjugada ao toxóide diftérico (PRP-D), primeira vacina contra Hib conjugada e, desde então, ao menos 38 países incluíram a imunização contra Hib no calendário de programa de vacinação infantil (DOMINGUEZ; DAUM, 2003).

Em 1999 ocorreu a primeira vacinação contra Hib no Brasil. Foi um passo importante, pois nessa época a meningite causada por esse patógeno era a segunda causa mais comum, responsável por 1,7 mil casos/ano e incidência média de 23,4 casos/100 mil crianças menores de 1 ano. Com a introdução da vacina, a redução do número de casos, incidência e óbitos por meningite no país caiu para 90% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). De acordo com os dados da Secretaria de Vigilância Sanitária, a incidência de meningite causada por Hib diminuiu de 0,33/100 mil habitantes em 2000 para 0,07/100 mil habitantes em 2011. Esse fato ocorreu, quando houve a troca da vacina monovalente para tetravalente, formada pela combinação do

PRP conjugado ao toxóide tetânico com a fração DTP – Difteria, Tétano e Pertussis. Dessa forma, houve maior cobertura vacinal e, conseqüentemente, refletiu na diminuição da incidência de meningite no país (DOMINGUEZ; DAUM, 2003).

As formulações vacinais existentes e disponibilizados na campanha de vacinação nacional são, a tetravalente combinada com a forma liofilizada da fração Hib conjugada (Hib-TT) e a fração DTP; a vacina pentavalente, formada pela fração tetravalente combinada (Hib-TT liofilizada + DTP com a fração HepB (hepatite B) (GADELHA; AZEVEDO, 2003) e atualmente está disponibilizada a pentavalente líquida, importada, onde todos os antígenos estão em um mesmo frasco.

3.4 *Metabolismo*

Haemophilus influenzae foi o primeiro genoma a ser sequenciado, em 1995, onde foram identificados genes responsáveis pela oxidação de glicose, galactose, maltose, ribose, entre outros, confirmando os estudos realizados por Holt que verificaram a utilização dessas fontes de carbono em mais de 90% das cepas de *Haemophilus* e outros capazes também de assimilar frutose, manose ou glicerol como fonte de carbono (FLEISCHMANN et al., 1995; SPIRO; GUEST, 1990).

As principais vias metabólicas para a geração de energia presentes no *Haemophilus influenzae* são a via glicolítica ou *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP), no qual as hexoses são oxidadas a piruvato como produto desta via, gerando 2 ATP e 2 NADH, e a via das pentoses fosfato (PPP – *Phosphate Pentoses Pathway*) (FLEISCHMANN et al., 1995).

Estudo *in silico* realizado por Raghunathan (2004) mostrou que Hi (cepa Rd KW20) cultivado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*), apresentam as enzimas da via glicolítica: frutose 1,6-bifosfato aldolase, transcetolase, transaldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase, fosfoglicerato mutase, enolase e piruvato quinase, confirmando os estudos previstos por Tatusov (1996) no qual afirmou que nas condições de microaerofilia e anaerobiose, a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMB) é preferencialmente escolhida para catabolismo de carboidratos, sendo completa e com ligação para a via das pentoses. Na conversão de fosfoenolpiruvato (PEP) à piruvato, foi observado um decréscimo na formação desse último, devido à baixa expressão da enzima piruvato quinase em condição anaeróbica. O piruvato pode ser convertido a várias moléculas diferentes, através da enzima piruvato

desidrogenase (PD) ou piruvato formiato liase (PFL). Para degradação do piruvato, a primeira enzima possui atividade em condições aeróbicas e a segunda, em microaerofilia e anaerobiose. Segundo o estudo feito por Raghunathan (2004), a enzima PD possui baixa atividade na ausência de oxigênio. Através da enzima NAD dependente lactato desidrogenase, piruvato pode ainda ser convertido a D-lactato (OTHMAN et al., 2014).

Othman (2014) demonstrou através de estudos genômicos e proteômicos que no TCA de *Hi*, as enzimas malato desidrogenase, fumarato hidratase, succinil CoA sintetase e α -cetoglutarato desidrogenase são as únicas presentes, com importante papel para a geração de energia utilizada na cadeia de transporte de elétrons (C.T.e) através da enzima fumarato redutase (responsável pela conversão de succinato à fumarato) e, confirmando assim, alguns modelos *in silico* existentes já mencionados (EDWARDS; PALSSON, 1999; RAGHUNATHAN et al., 2004; SCHILLING; PALSSON, 2000; TATUSOV, et al., 1996) além da informação reportada por Fleischmann que no genoma de *Hi* foi verificado a ausência de 3 enzimas do TCA, citrato sintase, isocitrato desidrogenase e aconitase. Após a oxidação de hexose pela via glicolítica, a entrada no TCA é realizada pela conversão do fosfoenolpiruvato (PEP) em oxaloacetato até a formação do α -cetoglutarato, comprovando que somente o ramo redutor está ativado completamente (FLEISCHMANN et al., 1995; OTHMAN et al., 2014). Na cadeia de transporte de elétrons bacteriana, além das redutases que medeiam a transferência de elétrons para os aceptores finais de elétrons, cada um com seu valor específico de potencial de redução, existem uma grande variedade de biomoléculas que apresentam a função de doar e transferir elétrons. As quinonas são lipoproteínas carreadoras de elétrons altamente hidrofóbicas e flexíveis, presentes na membrana plasmática. Apresenta a capacidade de receber elétrons provenientes dos substratos oxidados pelas desidrogenases e são repassados para os citocromos. Existem dois tipos de quinonas: as ubiquinonas e menaquinonas, diferindo uma da outra pela presença de um anel benzóico na menaquinona, como pode ser vista na Figura 8. Geralmente, a ubiquinona é encontrada na respiração aeróbia, enquanto a menaquinona na anaeróbia (KIM; GADD, 2008), contudo *Haemophilus influenzae* possui somente a menaquinona (HOLLÄNDER; MANNHEIM, 1975).

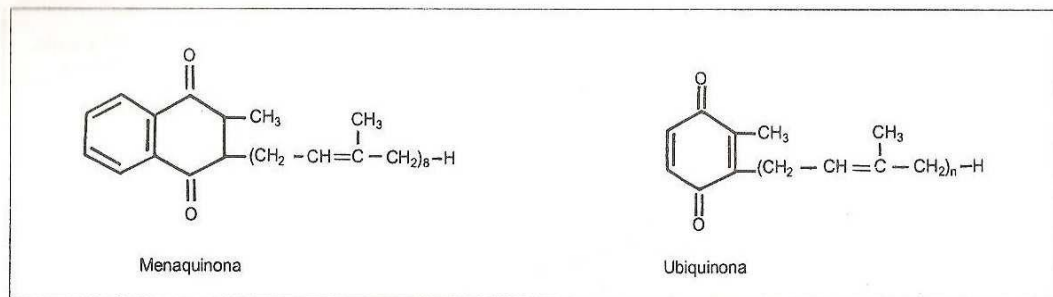


Figura 8- Estrutura da menaquinona e ubiquinona
(Extraído de BARBOSA; TORRES, 1999).

Os citocromos são heme proteínas classificados de acordo com o grupo heme prostético de sua estrutura. Podem carregar somente um elétron por vez e dessa forma a transferência de elétrons pela quinona para o citocromo ocorre em duas etapas e seu poder redox está intimamente relacionado com a valência do grupo heme. Apresentam uma grande diversidade de subtipos de citocromos de acordo com a espécie bacteriana, sendo os grupos principais os citocromos **a**, **b**, **c**, **d** e citocromo **o** utilizado de acordo com a disponibilidade de oxigênio do ambiente (Figura 9). Quando o oxigênio, comoceptor de elétrons, torna-se limitante, o uso dos citocromos é determinado de acordo com outros aceptores de elétrons disponíveis (KAMEN, HORIO, 1970; KIM; GADD, 2008; THÖNY-MEYER, 1997).

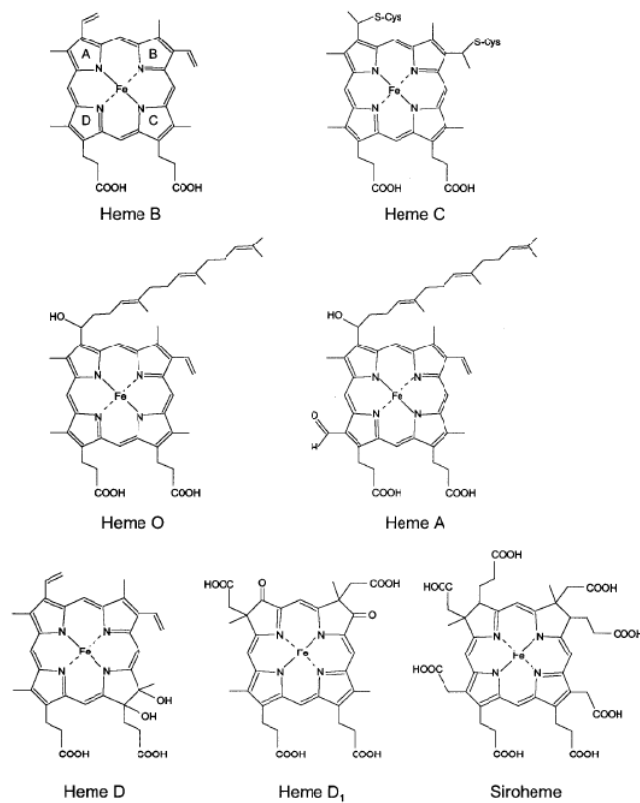


Figura 9 - Estrutura dos citocromos presentes em bactérias.

(Extraído de THÖNY-MEYER, 1997).

Com o TCA incompleto e, conseqüentemente, baixa produção de NADH, a C.T.e do Hib conta com cinco desidrogenases (entre elas, NADH, lactato e formiato desidrogenases) que transferem elétrons para menaquinona e para seis terminais de redutases, que repassam os elétrons para os aceptores de elétrons, desde oxigênio (na respiração aeróbia) quanto para os mais diversos aceptores na falta desse, como fumarato, dimetilsulfóxido (DMSO), óxido de trimetilamina (TMAO) e nitrato (na respiração anaeróbia) quando disponíveis (OTHMAN et al., 2014; RICHARDSON, 2000;).

As proteínas que compõem a C.T.e são praticamente todas conservadas, permitindo que Hi facilmente re-oxide o NADH, produzido pela oxidação parcial das fontes de carbono em variadas condições de crescimento. Com esse repertório metabólico, ao invadir o hospedeiro, Hi apresenta um arsenal metabólico para modular sua expressão gênica em resposta ao ambiente que se encontra mediante a variação do nível de oxigênio para uma eficiente colonização e patogenia (OTHMAN et al., 2014; WONG; AKERLEY, 2012). A Figura 10 abaixo ilustra as principais vias metabólicas do Hi.

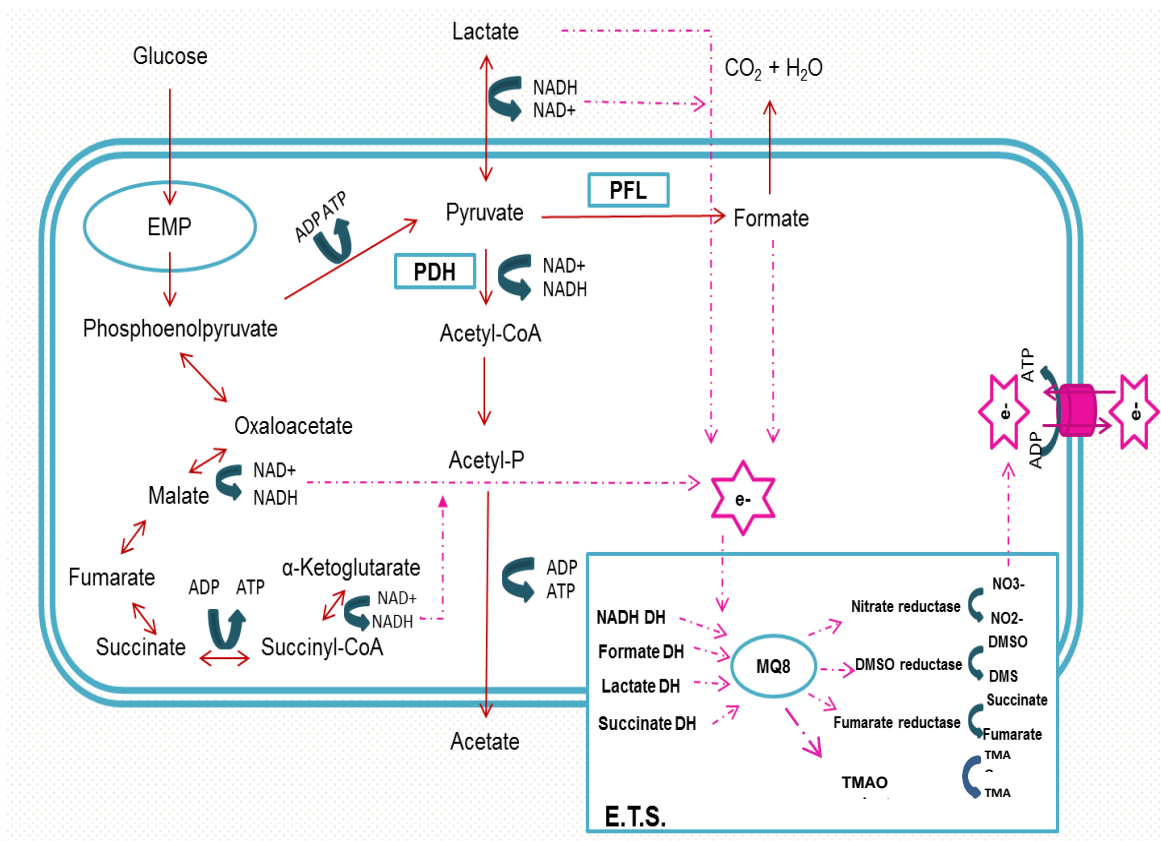


Figura 10 - Via de degradação de carboidratos de Hi

(Adaptado de OTHMAN et al 2014; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2015)

3.5 Regulação da respiração

Transdução de sinais em resposta a variação dos níveis de oxigenação representa um mecanismo do Hi no qual ele pode coordenar a expressão gênica necessária para uma colonização eficiente e patogênese em diferentes ambientes no hospedeiro. Essa regulação ocorre através de dois sistemas - *Anoxic redox control* (ArcA/B) e *Fumarate Nitrate Reductase* (FNR), ambos homólogos ao que acontece em *E. coli*. e modulam também mudanças nas vias catabólicas de carboidratos e fluxo de elétrons para produção de energia. Cada sistema atua independentemente quando há mudança entre crescimento celular aeróbio e anaeróbio e atuam como estímulo negativo ou positivo para ativá-los (GUNSALUS; PARK, 1994; WONG et al., 2007; WONG; AKERLEY, 2012). ArcA e ArcB são proteínas que atuam de maneira combinada e coordenam as vias de degradação de carboidratos à piruvato, e aos produtos finais do metabolismo aeróbio e anaeróbio, modulando a expressão de

genes e *operons* envolvidos no TCA e outros processos fermentativos, além de controlar o fluxo de elétrons via respiração, tanto anaeróbia quanto aeróbia (WONG et al., 2007).

Esse sistema é principalmente ativado em baixas concentrações de oxigênio. O sensor de quinase de ArcB autofosforila e transfere um grupo fosforil a ArcA, uma proteína ligada ao DNA na qual age como repressora ou ativadora, dependendo da configuração do promotor alvo. ArcB é um sensor proteico que detecta o sinal do ambiente enquanto ArcA é um regulador de um sistema proteico formado por dois componentes no qual modula a expressão gênica em resposta aos sinais do meio em que se encontra (GUNSALUS; PARK, 1994). Em Hi, o sistema ArcA/B atua como protetor contra o *stress* oxidativo durante a transição de baixa concentração de oxigênio para o de alta concentração (WONG et al., 2007), condição existente provavelmente na corrente sanguínea, após exposição súbita a defesa oxidativa de células fagocíticas. Essa regulação ocorre após ativação da expressão da proteína ferritina-ferro Dps (*DNA-binding Proteins from Starved cells*), responsável pela manutenção da homeostase da célula em ambiente com *stress* oxidativo e sequestra o ferro na presença de H₂O₂, prevenindo contra radicais hidróxidos tóxicos à célula. Porém, a regulação do complexo Dps por ArcA não foi demonstrado em *E. coli* ou outras espécies, sendo esse mecanismo de defesa anti oxidante relacionado a adaptações exclusivas de Hi no interior do hospedeiro (CALHOUN; KWON, 2011; WONG; AKERLEY, 2012).

FNR é uma proteína na qual a região sensorial possui quatro resíduos conservados de cisteína (Cys-20, -23, -29 e -122), que são essenciais para a atividade *in vivo* e a capacidade de se ligar ao grupo ferro-enxofre oxigênio sensível [4Fe-4S], sendo ativada somente em condições anaeróbicas interagindo diretamente com oxigênio molecular, através do cluster redox ferro-enxofre sensível presente no interior da proteína. FNR é importante no Hi para defesa contra *stress* oxidativo de espécies nitro ativas em condições anaeróbicas (HARRINGTON et al., 2009)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 *Preparação para os experimentos*

4.2.2 Microrganismo

Haemophilus influenzae tipo b (cepa GB329) utilizado para todos os experimentos foi proveniente do Núcleo de Coleção de Microrganismo do Instituto Adolfo Lutz. Para utilização no Laboratório de Bioprocessos I do Instituto Butantan, foi preparado o lote de trabalho em meio Grieses e estocado em nitrogênio líquido até o momento do uso (TAKAGI et al., 2007).

4.2.3 Meio de cultura

4.2.3.1 **Meio MP modificado (MMP)**

Meio de cultura utilizado para os primeiros ensaios foi o meio complexo MMP e sua composição é mostrada na Tabela 1. Para formulação do meio, cada componente foi pesado, solubilizado separadamente com água purificada. Todos os componentes foram juntados a um único reservatório para depois ajustar o pH para 7,5. O meio foi esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm onde foi mantido à temperatura ambiente e protegido da luz até o momento do uso.

Tabela 1 - Composição do meio MMP

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona de Soja	10,0
Extrato de Levedura	5,0
Hemina	0,03
NAD	0,015
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	2,5
Na ₂ PO ₄ ·H ₂ O	13,1
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,3
Glicose	5,0

4.2.3.2 Meio quimicamente definido (MD)

O meio quimicamente definido (MD), como apresentado na Tabela 2 e utilizado nos experimentos foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos I (IBu). Para cada componente do meio, foi preparada uma solução estoque concentrada, sendo as soluções de aminoácidos e vitaminas esterilizadas por filtração em membrana 0,22 µm e as soluções de sais e fontes de carbono, esterilizadas por autoclavação. Todas as soluções foram mantidas em geladeira até o momento da formulação do meio de trabalho.

Para formular o meio foi adicionado o volume necessário das soluções estoque para perfazer a concentração final de cada componente do meio, em fluxo laminar, e depois o pH ajustado para 7,0. NAD e hemina foram pesados, solubilizados e adicionados no momento de cada formulação do meio. O meio formulado foi esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm e mantido a temperatura ambiente, protegido da luz, até seu uso. Toda vidraria usada em contato com meio MD foi tratada com ácido nítrico 50%.

Tabela 2 - Composição do meio MD

Componentes	Concentração (g/L)
L-Cistina	0,2
NaCl	3,6
K ₂ SO ₄	0,2
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
EDTA	0,008
NH ₄ Cl	0,44
Ácido aspártico	0,42
Ácido glutâmico	1,0
Arginina	0,1
Glicina	0,2
Lisina	0,3
Metionina	0,3
Serina	0,4
Histidina	0,3
Leucina	0,7
Tirosina	0,115
Glutamina	0,5
Isoleucina	0,5
Triptofano	0,11
Valina	0,4
Fenilalanina	0,25
Tween 80	0,04
Lactato de sódio 50%	2,0
Glicerol	3,0
Uracila	0,1
Hipoxantina	0,03
Inosina	2,0
K ₂ HPO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	4,0
Tiamina.HCl	0,015
Pantotenato de cálcio	0,002
NAD	0,01
Hemina	0,01

4.2.3.3 Preparo da solução de aceptores de elétrons

Os aceptores utilizados nos experimentos foram nitrato de sódio, fumarato de sódio dibásico, DMSO e TMAO. Para cada acceptor foi preparada solução estoque concentrada (200 g/L), pesado, solubilizado em água purificada e filtrada em membrana 0,22 μm . As soluções foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso.

4.3 Experimentos

4.3.2 Pré inóculo e inóculo

Para a fase de adaptação do Hib após descongelamento da suspensão bacteriana, 400 μL da suspensão foi transferida para 50 mL de meio de cultura (MMP ou MD - Figura 11). O frasco foi incubado em jarra de anaerobiose, a 37 °C, até atingir densidade óptica ($\text{DO}_{540\text{nm}}$ de 0,05 - aproximadamente 10 horas).

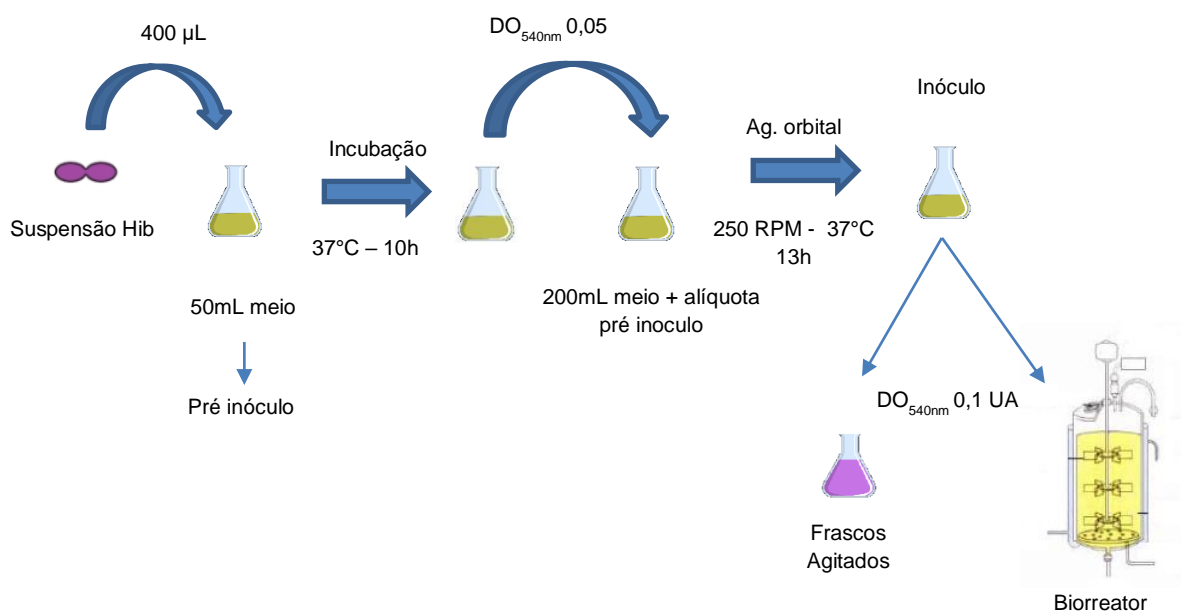


Figura 11 - Preparo do pré inóculo e inóculo.

Para o preparo do inóculo, foi transferido volume de pré inóculo suficiente para obter DO_{540nm} inicial de 0,05 em 100 mL de meio de cultura (MMP ou MD). O inóculo foi deixado sob agitação a 250 RPM e 37 °C, por aproximadamente 13 horas em agitador orbital (*New Brunswick Scientific Series 25*).

4.3.3 Ensaio em frascos agitados

Os ensaios em frascos agitados foram realizados no agitador orbital INNOVA 44R (*New Brunswick Scientific*), tanto do meio MMP quanto do meio MD. Todos os ensaios foram realizados em frascos *Schott*, com agitação de 75 RPM para garantir que não houvesse sedimentação das células, temperatura de 37 °C e DO_{540nm} inicial de 0,1. Amostras foram coletadas a cada duas horas para leitura da DO_{540nm} e análises de metabólitos.

4.3.3.1 **Meio MD com diferentes fontes de carbono**

Foram testadas diferentes fontes de carbono e em diferentes combinações, na presença de 30 mM de fumarato de sódio, como ilustra a Figura 12 abaixo:

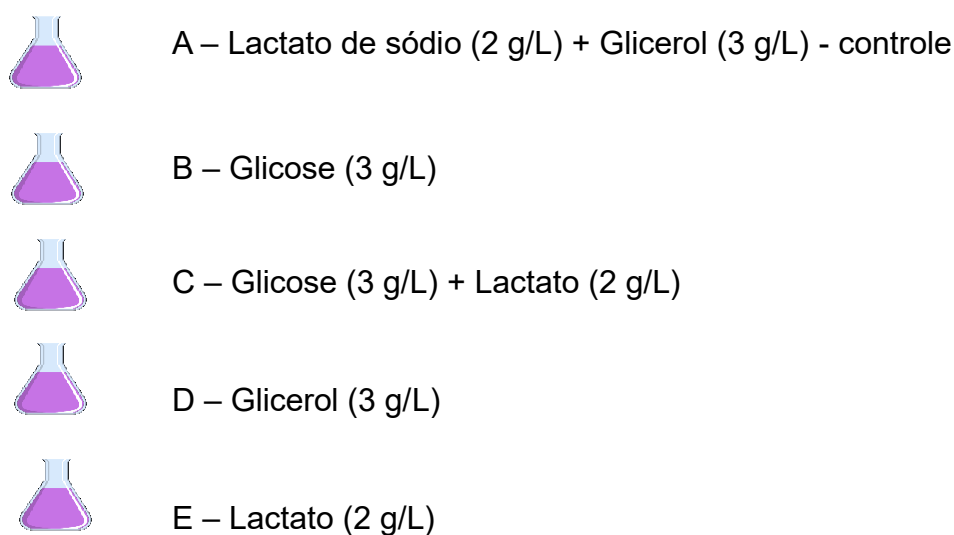


Figura 12 - Ensaio em frascos agitados com diferentes fontes de carbono e suas combinações

Os ensaios foram realizados em frascos agitados a 75 RPM, temperatura de 37 °C. Amostras foram coletadas a cada 2 horas para acompanhar o crescimento celular e posterior análises de carboidratos e ácidos orgânicos

4.3.4 Ensaio em biorreator

Para os ensaios em biorreator (*Ralf Bioengineering*) foram utilizados dois reatores com capacidade para 500 mL cada (R1 e R2). A introdução dos gases (nitrogênio ou ar comprimido) nos reatores foi regulada via software (*Scada*) conectado ao fermentador e mantido na vazão de 0,500 NI/min. Em anaerobiose (Figura 13), antes do inóculo, foi introduzido nitrogênio submerso ao meio de cultura, para remoção de oxigênio, acompanhada pela diminuição da tensão de oxigênio na sonda de pO_2 . Após a inoculação, a introdução do gás nitrogênio foi superficial e mantida até o final do cultivo. A agitação foi mantida em 150 RPM, temperatura e pH controlados a 37 °C e 7,0 respectivamente.

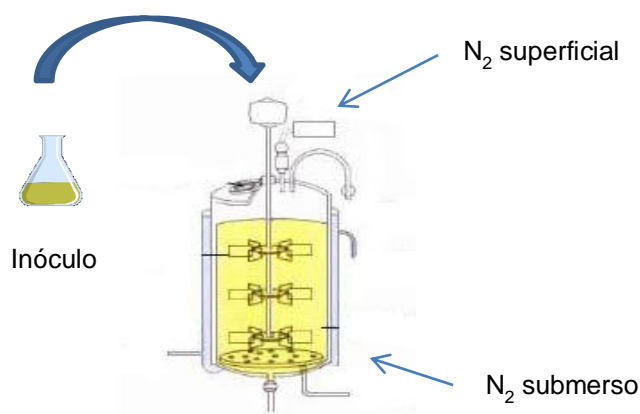


Figura 13 - Ensaio em biorreator de Hib em anaerobiose

No ensaio em aerobiose (Figura 14, controle), o ar comprimido foi introduzido de modo submerso com controle de pO_2 mantido a 30% da saturação de ar, onde a

agitação variou de 150 - 800 RPM, temperatura a 37 °C e pH controlado a 7,0. A sonda de pO_2 foi calibrada na agitação de 800 RPM, temperatura de 37 °C onde o 100% foi com ar comprimido e o zero (0%) foi considerado o eletrônico, desconectando o cabo da sonda de pO_2 do painel.

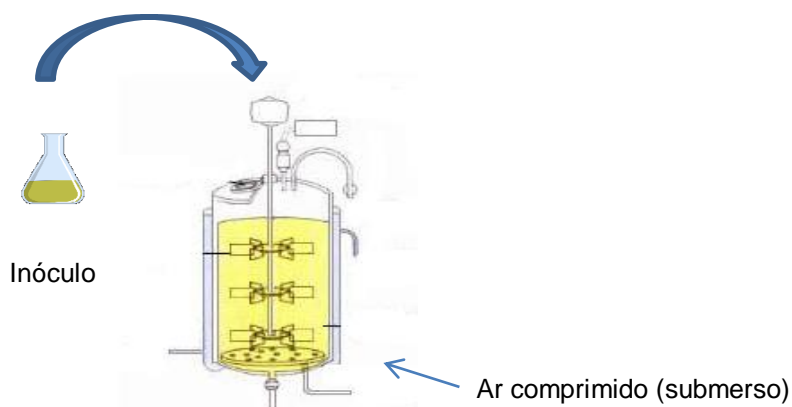


Figura 14 - Ensaio em biorreator de Hib em aerobiose

Foram realizados dois ensaios com transição da condição de aerobiose para a anaerobiose (Figura 15). Todos os ensaios iniciaram na condição de aerobiose como descrito acima e em presença de 30mM de fumarato de sódio (4,8 g/L) como acceptor. No primeiro ensaio, o acceptor foi adicionado quando houve a troca do gás oxigênio para gás nitrogênio (A). O segundo ensaio foi realizado com adição de fumarato de sódio desde o início do cultivo, e a troca de gases foi realizada de forma gradual (B). Essa troca gradual dos gases foi realizada quando a DO_{540nm} atingiu a faixa de 2-3 (metade da fase exponencial). A vazão de oxigênio foi diminuída a cada 0,05 NI/min (vazão inicial de 0,500 NI/min) e a vazão de nitrogênio aumentada a cada 0,05 NI/min. Para garantir a troca dos gases no meio de cultura, a aeração ocorreu de forma submersa. Ao chegar à vazão de 0,500 NI/min em nitrogênio, trocou-se a aeração para superficial.

Um último grupo de ensaio foi realizado em aerobiose em presença de fumarato de sódio (C), adicionado desde o início do cultivo. As condições de cultivo foram às mesmas utilizadas no ensaio em aerobiose anteriormente descrito.

Amostras foram retiradas a cada hora de cultivo para leitura de DO_{540nm} , e, análise dos metabolitos produzidos e substrato consumido.

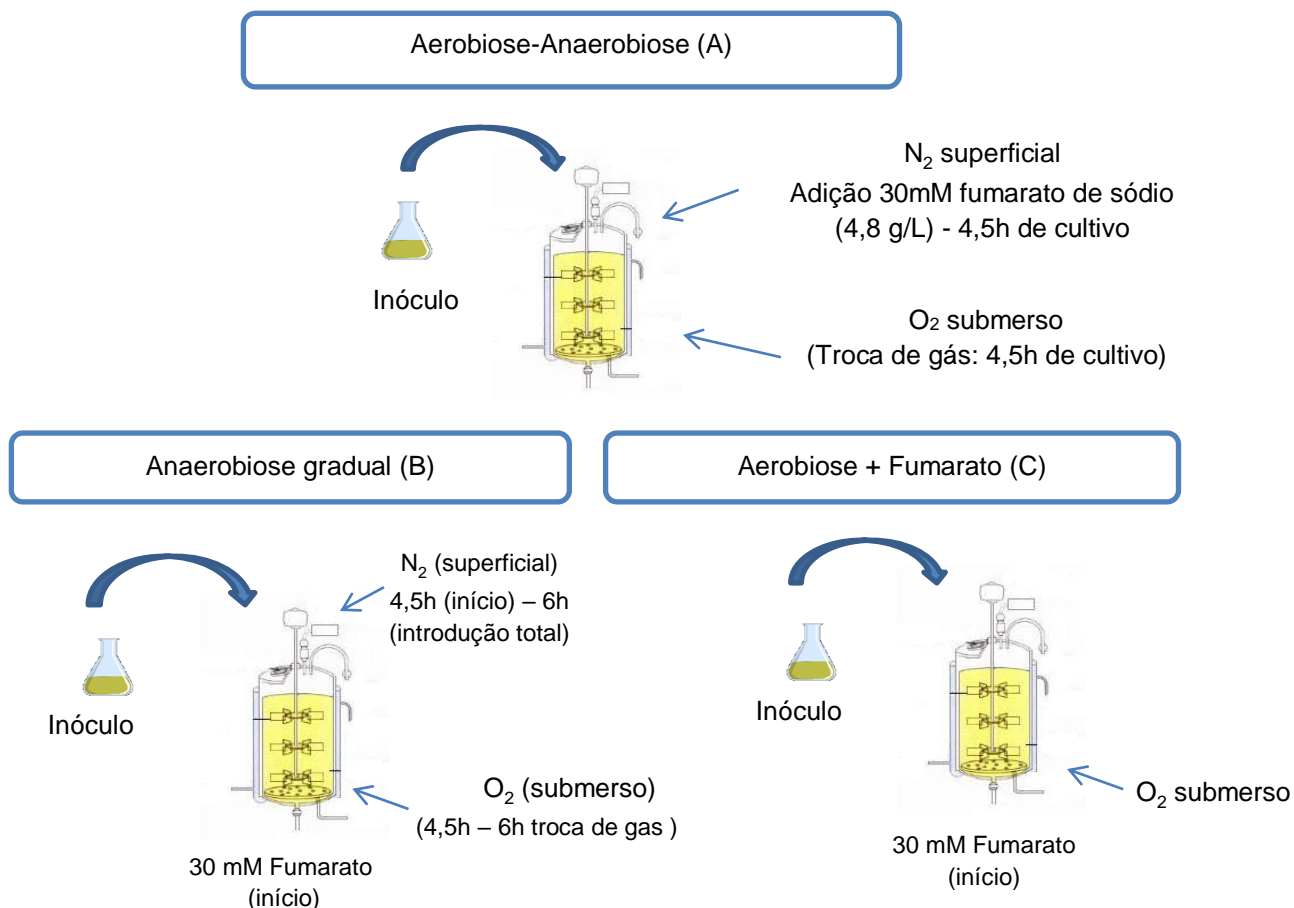


Figura 15 - Ensaio em biorreator em diferentes condições de cultivo

4.3.5 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

Amostras coletadas durante os cultivos foram alíquotadas em tubo *Eppendorf* (aproximadamente 1 mL), centrifugada para remoção de células e o sobrenadante, guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até seu uso para quantificação da produção de ácidos orgânicos, consumo das fontes de carbono e produção de polissacarídeo.

As quantificações de carboidratos e ácidos orgânicos foram realizadas por cromatografia líquida de alta afinidade (*High Performance Liquid Chromatography - HPLC*) no equipamento Agilent Infinity 1260 em coluna Hiplax, fase móvel de ácido sulfúrico na concentração de 10 mM, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 60°C . Para realizar as análises, as amostras foram centrifugadas a 16000g por durante 5 minutos para retirada de possíveis insolúveis, 100 μL de sobrenadante foi adicionado em 900

μL de ácido sulfúrico na concentração de 50 mM (diluição 10x), filtrado em membrana 0,45 μm para depois serem injetados a coluna.

A curva padrão utilizada para a medida de ácidos orgânicos e carboidratos foram: 1- Padrão comercial (*Biorad*) contendo succinato de sódio, acetato de sódio, formiato de sódio, malato de sódio e glicose; 2 - No laboratório foram preparadas soluções estoques na concentração de 2 g/L de fumarato de sódio (Sigma), lactato de sódio (Sigma) e glicerol (Synth). Para a curva padrão, utilizou-se concentrações de 0,2 a 2 g/L para fumarato e 0,1 a 2 g/L para lactato e glicerol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Haemophilus influenzae foi o primeiro microrganismo a ter seu genoma sequenciado, entretanto poucas informações sobre o seu metabolismo são reportadas na literatura (FLEISCHMANN et al., 1995). Apresenta grande versatilidade genética e pode atuar em condições variadas quando invade o hospedeiro, podendo causar doenças graves do ponto de vista clínico, ou ainda causar doenças não invasivas e de menor risco, seja em nicho de aerobiose ou de anaerobiose. Os dados referentes às rotas metabólicas atuais do Hi são majoritariamente oriundos de modelos *in silico*, sendo, portanto, possível de ter apenas uma previsão do comportamento do microrganismo. Os relatos são ainda mais escassos quando se refere à respiração anaeróbia e a cadeia de transporte de elétrons.

Neste trabalho são apresentados ensaios em frascos agitados e em biorreator para estudar o crescimento celular de *Haemophilus influenzae* tipo b e formação de metabólitos, em presença de diferentes aceptores de elétrons e em diferentes taxas de oxigênio.

5.2 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos em frascos agitados foram realizados como uma prévia para os cultivos que serão realizados em biorreatores. Assim, esses ensaios buscaram avaliar o uso de nitrato de sódio, DMSO e fumarato de sódio como aceptores de elétrons, em ambiente com baixa tensão de oxigênio. Esses aceptores de elétrons são comumente utilizados por várias bactérias patogênicas anaeróbias facultativas sendo, portanto, selecionadas para esse trabalho (BARRETT; KWAN, 1985; BILOUS; WEINER, 1985; KRÖGER, 1974; MCCRINDLE et al., 2005).

5.2.2 Cultivo de Hib no meio MMP em presença de diferentes aceptores

O meio MMP é utilizado para o cultivo do Hib na produção de polissacarídeo e foi desenvolvido inicialmente por Carty (1985) e modificado por Takagi (2007), onde foi aumentado a concentração de hemina e NAD. A concentração dos aceptores inicialmente utilizada foi de 20 mM, baseada nos estudos realizados por Sinclair e White (1970), que utilizou 20 mM de KNO_3 , como acceptor de elétrons, em cultivos anaeróbios de *Haemophilus parainfluenzae* (SINCLAIR; WHITE, 1970). O perfil cinético de crescimento para cada acceptor pode ser observado na Figura 16. Entre os três aceptores testados, o melhor crescimento foi observado na presença de DMSO, que atingiu $\text{DO}_{540\text{nm}}$ de 3,50 ao final de 10 horas de cultivo, seguido de fumarato de sódio com $\text{DO}_{540\text{nm}}$ de 2,72 e nitrato de sódio com $\text{DO}_{540\text{nm}}$ de 1,55. O meio MMP sem acceptor, usado como controle, obteve $\text{DO}_{540\text{nm}}$ de 2,33, crescimento levemente melhor do que com o nitrato de sódio como acceptor.

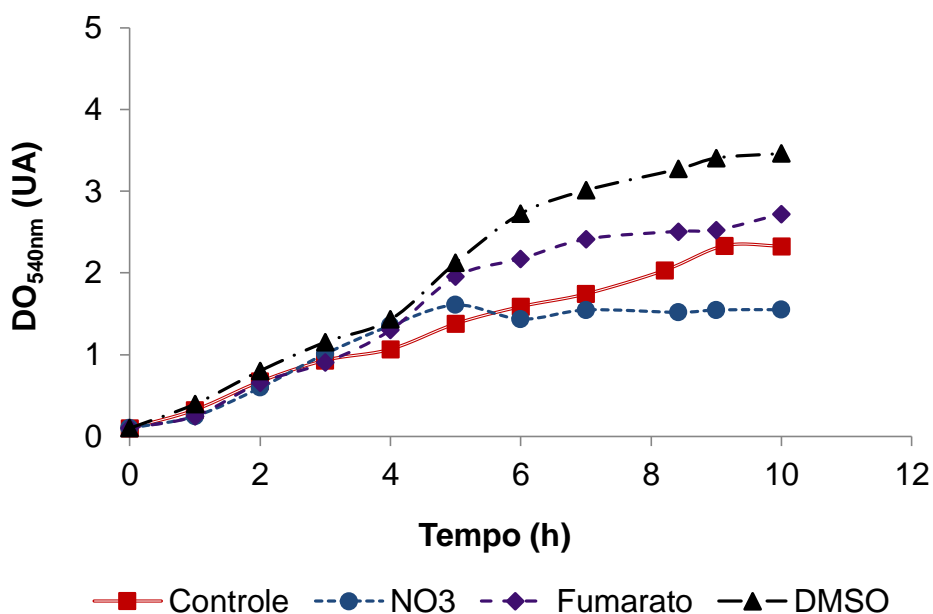


Figura 16 - Cultivo de Hib em anaerobiose utilizando meio complexo MMP

Para avaliar a influência da combinação dos aceptores no crescimento celular, foram realizados ensaios considerando a mistura dos aceptores, sendo elas: 1 -

DMSO e nitrato de sódio; 2 - fumarato de sódio e nitrato de sódio e 3 - DMSO e fumarato de sódio; o perfil cinético de crescimento é apresentado nas figuras 17 a 19 a seguir.

A combinação dos aceptores DMSO e nitrato de sódio resultou em uma DO_{540nm} de 1,81, perfil muito semelhante ao ensaio quando se utilizou somente o nitrato de sódio como o acceptor de elétrons e visualizado na Figura 17. A DO_{540nm} apresentada foi ligeiramente menor do que o controle (MMP sem acceptor), cuja a DO_{540nm} foi de 2,33. Entretanto, o uso somente de DMSO como acceptor permitiu um crescimento celular ao redor de 3,50.

Esse resultado pode ser relacionado aos dados encontrados por Bilous e Weiner (1985), no qual ao cultivarem *E. coli* com glicerol como fonte de carbono em diferentes tensões de oxigênio e DMSO como acceptor final de elétrons, observaram que a DMSO redutase, enzima responsável pela redução de DMSO para dimetilsulfeto (DMS), foi inibida em presença de oxigênio e em presença de nitrato no meio de cultura (BILOUS; WEINER, 1985). Hi apresenta em seu genoma a DMSO redutase e assim sendo, além dos ensaios em frascos agitados o ambiente não estar completamente isento de oxigênio, a adição de nitrato de sódio no meio MMP pode ter ocasionado na inibição, resultando no baixo crescimento de Hib.

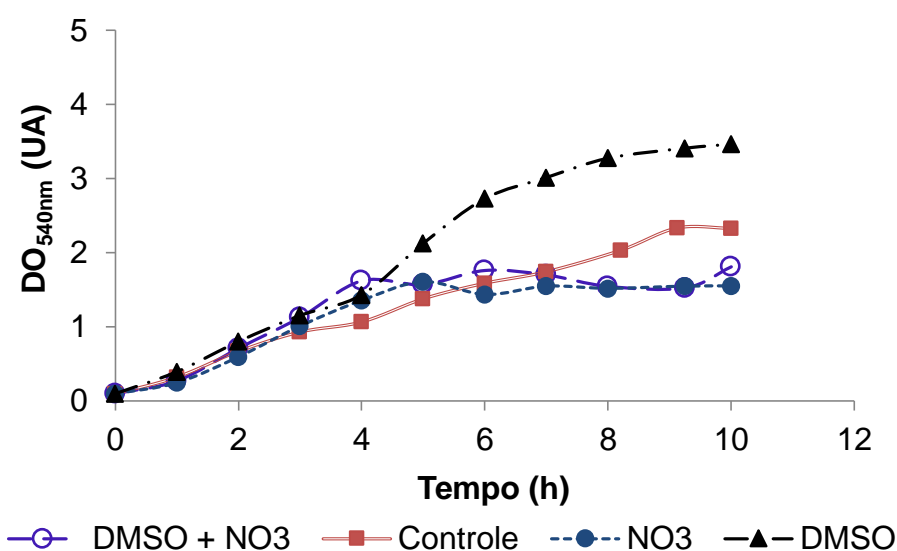


Figura 17 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em presença de nitrato de sódio, DMSO e da mistura DMSO + nitrato de sódio.

A combinação dos aceptores fumarato de sódio e nitrato de sódio (Figura 18) mostrou um perfil cinético de crescimento com DO_{540nm} de 1,57, muito similar ao perfil individual do nitrato de sódio (DO_{540nm} de 1,55). Porém, esse crescimento foi ligeiramente abaixo do encontrado para o controle, que apresentou uma DO_{540nm} de 2,33, e do perfil cinético individual do fumarato de sódio, que apresentou uma DO_{540nm} de 2,72.

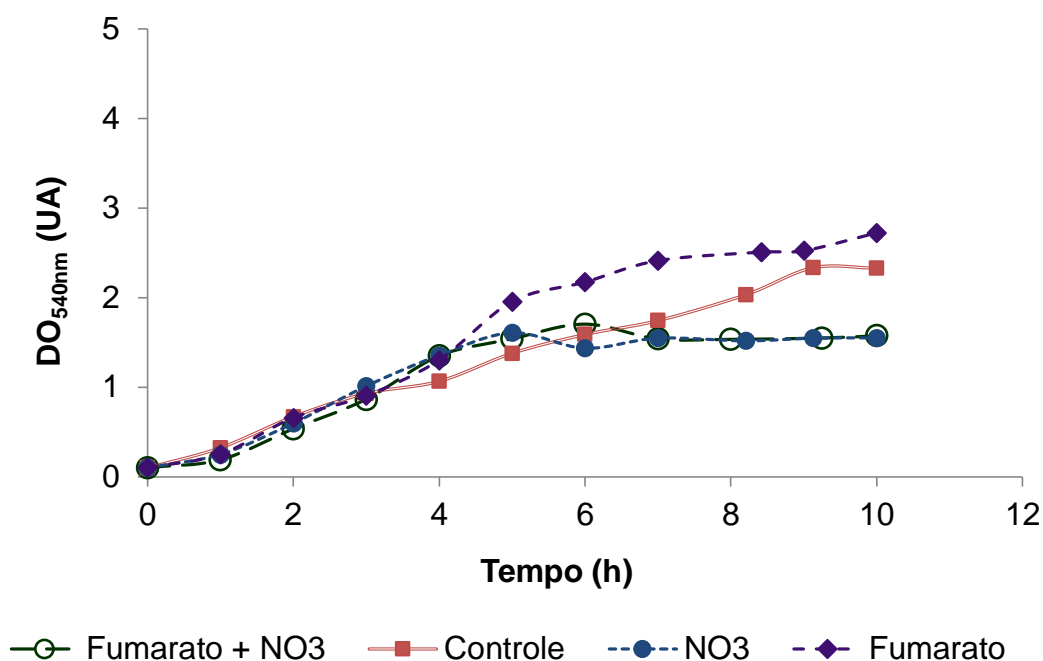


Figura 18 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em presença de nitrato de sódio, fumarato de sódio e a mistura da fumarato de sódio e nitrato de sódio.

Já a combinação DMSO e fumarato de sódio apresentou crescimento celular superior entre as misturas apresentadas, com DO_{540nm} de 4,08 (Figura 19). Entretanto, o crescimento não foi muito maior em comparação ao apresentado somente com o DMSO, que atingiu uma DO_{540nm} de 3,50, seguindo de fumarato com DO_{540nm} de 2,5.

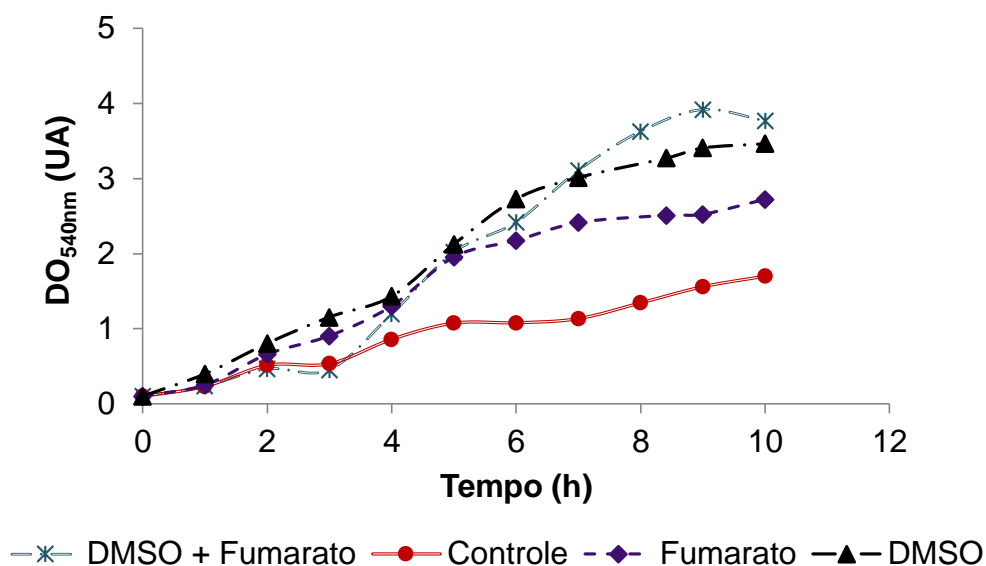


Figura 19 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em presença de DMSO, fumarato de sódio e da mistura fumarato de sódio e DMSO.

5.2.3 Cultivo de Hib no meio definido em presença de diferentes aceptores

Os mesmos aceptores citados foram também testados nos cultivos de Hib, com o meio definido (MD). Esse meio foi proposto por Herriot et al. (1970) inicialmente para transformação de Hi; contém lactato e glicerol como fontes de carbono, aminoácidos como fontes de nitrogênio, sais, vitaminas e fator de crescimento. A composição deste meio foi adaptada, no Laboratório de Bioprocessos – IBU, para adequar as necessidades nutricionais de Hib para resultar em uma maior produção de PRP. O meio MD apresenta a vantagem de possuir componentes e concentrações definidas, permitindo a quantificação de metabólitos formados e consumo de substratos mais facilmente devido à diminuição de interferentes presentes no meio, além disso, poderá favorecer no processo de purificação do polissacarídeo. Assim como o meio MMP, esse meio foi utilizado nos ensaios em frascos agitados, para verificar o perfil de crescimento na presença dos aceptores.

Na Figura 20, é ilustrado o perfil de crescimento de Hib com os aceptores DMSO, fumarato de sódio, nitrato de sódio e MD sem aceptor (controle). Em meio MMP, a DO_{540nm} obtida foi ligeiramente maior em relação ao meio definido,

provavelmente pelo fato de conter nutrientes da peptona de soja e do extrato de levedura que devem ter contribuído para esse maior crescimento. Fumarato de sódio e DMSO apresentaram crescimento semelhantes, com DO_{540nm} de 1,51 e 1,70, respectivamente. Nitrato de sódio apresentou DO_{540nm} de 1,12 e controle, DO_{540nm} de 1,33.

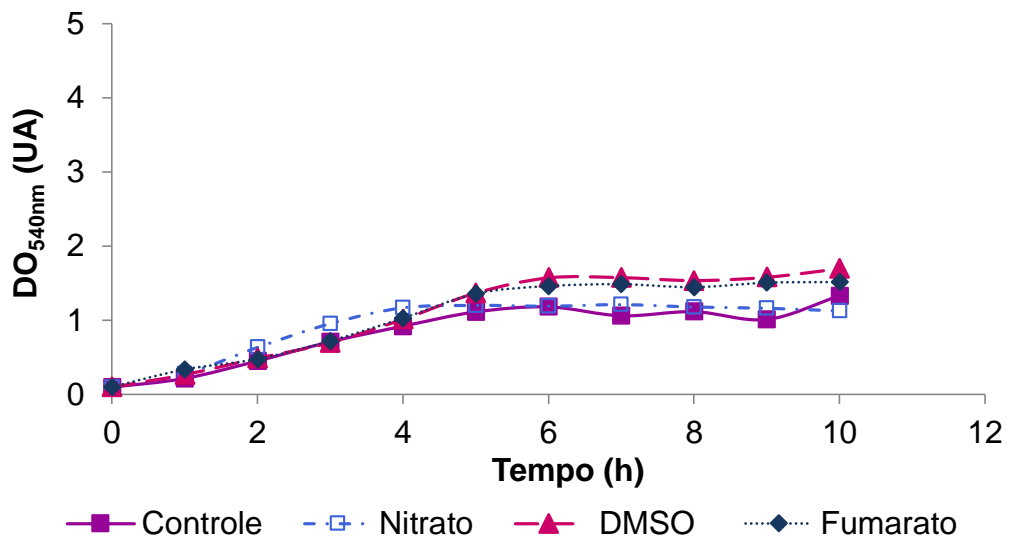


Figura 20 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib na presença de nitrato de sódio, DMSO, fumarato de sódio utilizando o meio MD

Para verificar se o efeito da concentração do acceptor poderia ser um fator limitante para o crescimento celular da bactéria, foi realizado ensaio com concentrações crescentes de fumarato de sódio. Foram utilizadas concentrações de 20mM, 30mM, 40mM, 60mM e 80mM, um controle sem acceptor como ilustrado na Figura 21.

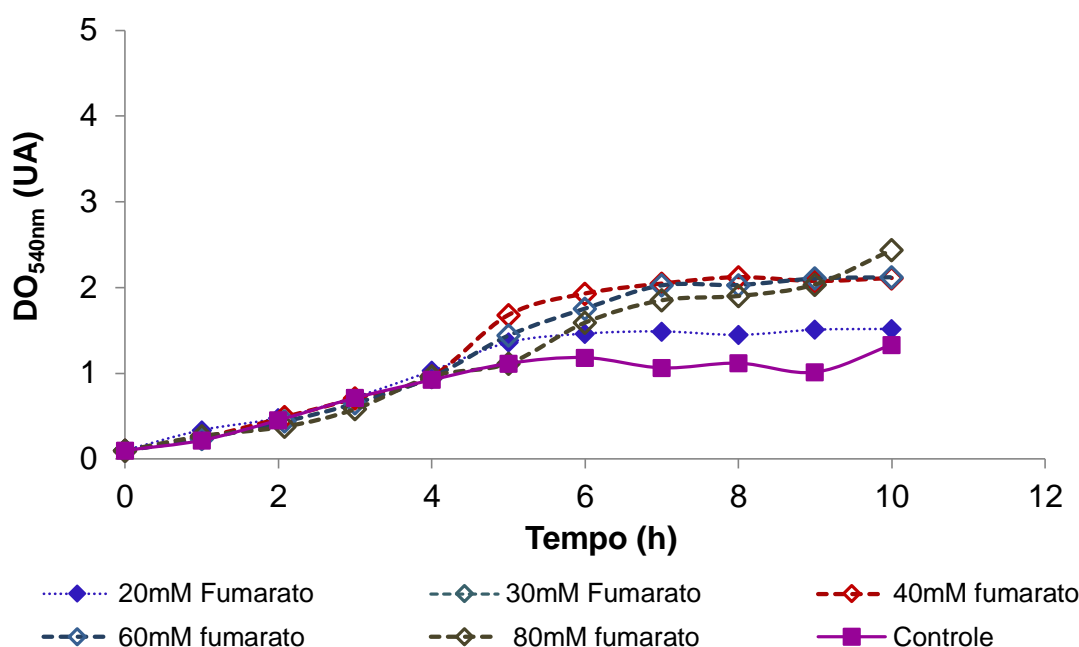


Figura 21 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib, em meio MD, na presença de diferentes concentrações de fumarato de sódio.

É possível verificar que até a quarta hora de cultivo, o crescimento foi muito similar entre eles nas concentrações de 30 a 80 mM, havendo uma diferenciação a partir da quinta hora de cultivo, com DO_{540nm} entre 1,92 a 2,43. Deste modo, para dar continuidade, a concentração de trabalho escolhida foi 30 mM, uma vez que o crescimento celular se manteve similar ao de maior concentração (80 mM).

O uso dos aceptores de elétrons pelo microrganismo é mediado pelo potencial de redução padrão que cada acceptor possui, nas condições de pH 7,0 e temperatura de 25°C. Quanto mais positivo é o valor do potencial, maior a interação com os elétrons transferidos pelos doadores (KIM; GADD, 2008). Na literatura, existem relatos sobre o uso de DMSO por Hib devido à existência de um *operon* no qual é expressa a enzima DMSO redutase. Essa enzima é pertencente à família das molibdoenzimas (dependentes de molibdênio como cofator) ferro-enxofre ([Fe-S]), ligadas à membrana e presente na C.T.e (MCCRINDLE et al., 2005; OTHMAN et al., 2014). Para o par redox DMSO/DMS, o potencial de redução padrão é +160mV (MCCRINDLE et al., 2005). Fumarato faz parte do metabolismo de Hib como parte integrante do TCA, podendo ser formado pelas reações reversíveis de succinato a fumarato e malato a fumarato (KEGG, 2015). A redução do fumarato se dá através da enzima fumarato redutase, uma flavoproteína de membrana formada por três grupos ferro-enxofre,

ligada covalentemente a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e ligada a C.T.e pelo complexo II, esse último um componente importante tanto na C.T.e, como no TCA, para a oxidação de succinato a fumarato pela enzima succinato desidrogenase. O potencial de redução padrão da dupla fumarato/succinato é de +30mV (CECCHINI et al., 2000; IVERSON et al., 1999).

O nitrato também possui várias referências como o principal acceptor na respiração anaeróbia para várias bactérias. No estudo *in silico* realizado por Kolker (2003) e confirmados por Raghunathan (2004) com a cepa Rd KW20, foi observada a expressão da enzima nitrato redutase periplasmática nas células cultivadas em microaerofilia e anaerobiose, sendo essa enzima parte de um *operon* no qual nitrato pode ser usado como acceptor final de elétrons. Somado a existência do *operon*, nitrato possui ainda alto potencial de redução padrão para o par redox NO_3/NO_2 (+430mV), próximo do par redox $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (+820mV), e, portanto, um candidato promissor na cadeia de transporte de elétrons, na respiração anaeróbia. Entretanto, os resultados obtidos mostraram que em todos os ensaios realizados com nitrato de sódio como acceptor de elétrons, obteve o menor crescimento tanto em meio MMP quanto em MD. Durante os ensaios, foi observado também que nas primeiras horas de cultivo (entre a segunda e quarta hora), houve mudança na coloração do meio MMP, de marrom para cobre e do MD, de esverdeado para rosado, conforme ilustrado na Figura 22. Não se sabe ao certo o que acarretou essa mudança, a hipótese mais provável é a oxidação do ferro presente na hemina pelo nitrito de sódio, produto gerado na redução de nitrato de sódio. Sem o ferro da hemina, Hib não é capaz de formar citocromos e assim, sua C.T.e fica comprometida, afetando seu crescimento.

Deste modo, para a continuidade deste estudo, não foi utilizado nitrato de sódio para os ensaios em reator.



Figura 22 - Cultura de Hib na presença de nitrato de sódio em MD (esquerda) e MMP (direita).

5.2.3.1 Cultivo em frascos agitados com diferentes fontes de carbono

O gênero *Haemophilus* é dividido em sete biotipos (I-VII), realizado por Kilian (1976), de acordo com características bioquímicas como produção de indol, hidrólise da uréia, fermentação de determinados carboidratos e descarboxilação da ornitina. Tiller (1982) classificou e dividiu os biótipos de A – E, de acordo com a capacidade de fermentação dos açúcares frutose, xilose e maltose. Esse sistema de classificação por biotipos demonstrou ser de grande valia para separar grupos clinicamente importantes, causadores de seps e meningite, como o caso do sorotipo b, classificado como biotipo I e observado comumente em isolados clínicos de pacientes com doenças invasivas graves.

Tiller correlacionou também o sorotipo, o biotipo e a classificação pela fermentação de açúcar com a importância clínica nos nichos nos quais as cepas estudadas foram isoladas dos pacientes, sendo todos esses parâmetros interligados. O grande número de cepas isoladas de pacientes com meningite mostrou pertencer ao sorotipo b, associado ao biotipo I e esse ainda, correlacionado com o padrão A para carboidrato fermentado (capaz de fermentar frutose e xilose, mas não consegue fermentar maltose). Já os isolados clínicos de pacientes com bronquite crônica, demonstrou possuir cepas com pequena capacidade de produção de cápsula, pertencente ao biotipo II e com padrão A e B (capaz de fermentar somente frutose) para fermentação de açúcares. Já os biótipos III a VII estão relacionados as cepas não capsuladas, portanto encontrados em isolados de pacientes com manifestações clínicas não invasivas, e com cepas de Hi pertencentes a pacientes saudáveis, ou seja, participantes da microbiota normal do trato respiratório superior (KILIAN, 1976; TILLER, 1982). Portanto, o tipo de açúcar utilizado pela bactéria como fonte de carbono, como foi demonstrado por Tiller, possui um papel relevante na virulência e patogenicidade do microrganismo e assim, determina as particularidades das cepas de Hi capazes de invadir e provocar manifestações clínicas em seu hospedeiro.

Dentro desse panorama, da utilização de diferentes fontes de carbono pelo Hi, foi realizado um ensaio para analisar o crescimento de Hib quando são utilizados outros substratos além da glicose. Utilizando fumarato de sódio como aceptor de elétrons, foi formulado meio MD contendo como fonte de carbono lactato de sódio, glicerol e glicose individualmente, e a combinação entre os três substratos. O perfil de

crescimento de Hib em todos os ensaios (A - E) realizados pode ser observado na Figura 23. É possível inferir que a combinação dessas fontes de carbono não refletiu em diferenciação significativa no crescimento do Hib, porém, os meios formulados com glicose (B e C) apresentaram DO_{540nm} levemente superior com 2,69 e 2,32, respectivamente, enquanto o meio MD usado como controle (A) contendo lactato e glicerol, apresentou uma DO_{540nm} de 1,92; similar aos demais meios formulados (D e E), com DO_{540nm} ao redor de 1,81.

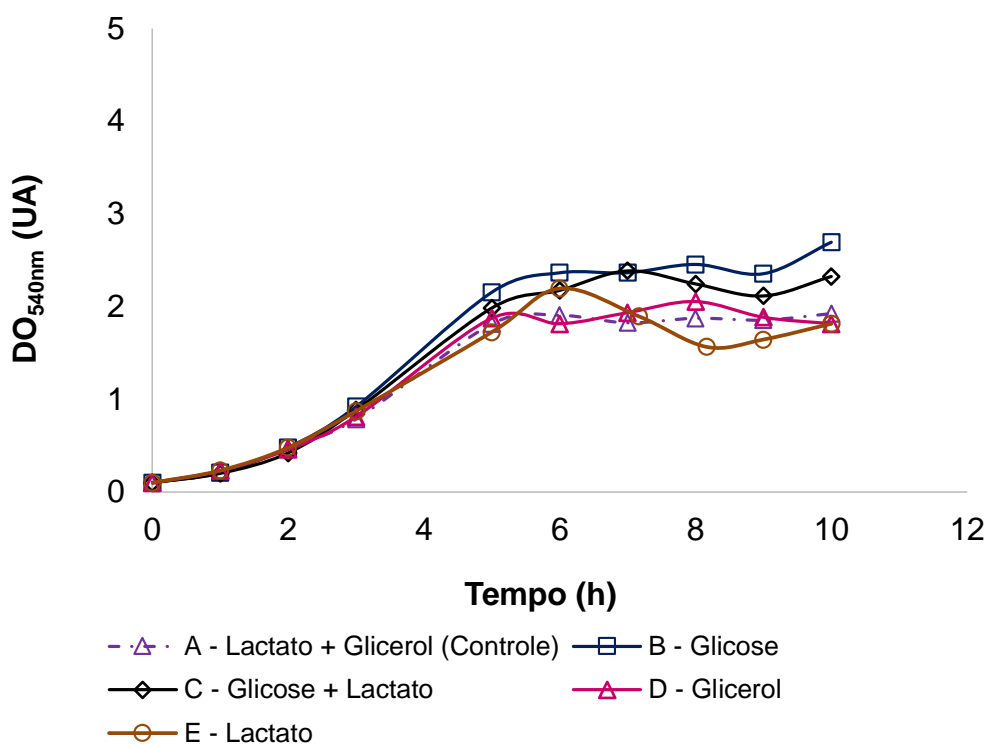


Figura 23 - Cultivos de Hib em diferentes combinações de fontes de carbono.

Pela análise de metabólitos ácidos, indicada na Figura 24, na presença de 30 mM fumarato de sódio como aceptor final de elétrons foi verificada a formação de succinato na ordem de grandeza de 10 g/L em todos os ensaios realizados. A principal fonte para formação de succinato é através da redução de fumarato. Entretanto, a concentração produzida foi maior do que a concentração de fumarato de sódio adicionada inicialmente. O meio MD é rico em aminoácidos e, dessa forma, pode ter sido usado para a produção de fumarato e, conseqüentemente, mais succinato, uma vez que o fumarato de sódio adicionado como aceptor foi totalmente consumido em todos os ensaios. Como explicitado anteriormente, o aceptor foi totalmente

consumido, mas nos ensaios de B – E a partir da sexta hora de cultivo, enquanto no ensaio controle (A), o consumo total do acceptor ocorreu na segunda hora e formando succinato ao redor de 7 g/L.

Em todos os ensaios, a partir dos respectivos carboidratos fornecidos, o acetato produzido variou de 1,0 g/L a 1,60 g/L, sendo a maior produção ocorrida no meio contendo glicose e lactato (C). Formiato foi produzido somente nos meios em que a glicose estava presente, na concentração de 0,47 g/L e 0,20 g/L (B e C, respectivamente). Malato foi produzido em todos os meios testados, entretanto em baixa concentração de 0,1 g/L a 0,5 g/L e foi consumido totalmente ao longo do cultivo. Já as fontes de carbono, os meios nos quais lactato de sódio foi adicionado, seu consumo foi mais expressivo e quase totalmente esgotado, chegando a 0,90 g/L ao final de 10 horas de cultivo. Nos demais meios formulados (B e D), o consumo das fontes de carbono obtiveram pequena variação ao longo do cultivo e na décima hora, a concentração de glicerol estava na ordem de 1,80 g/L (A), 1,46 g/L (D) e de glicose, 1,30 g/L (C).

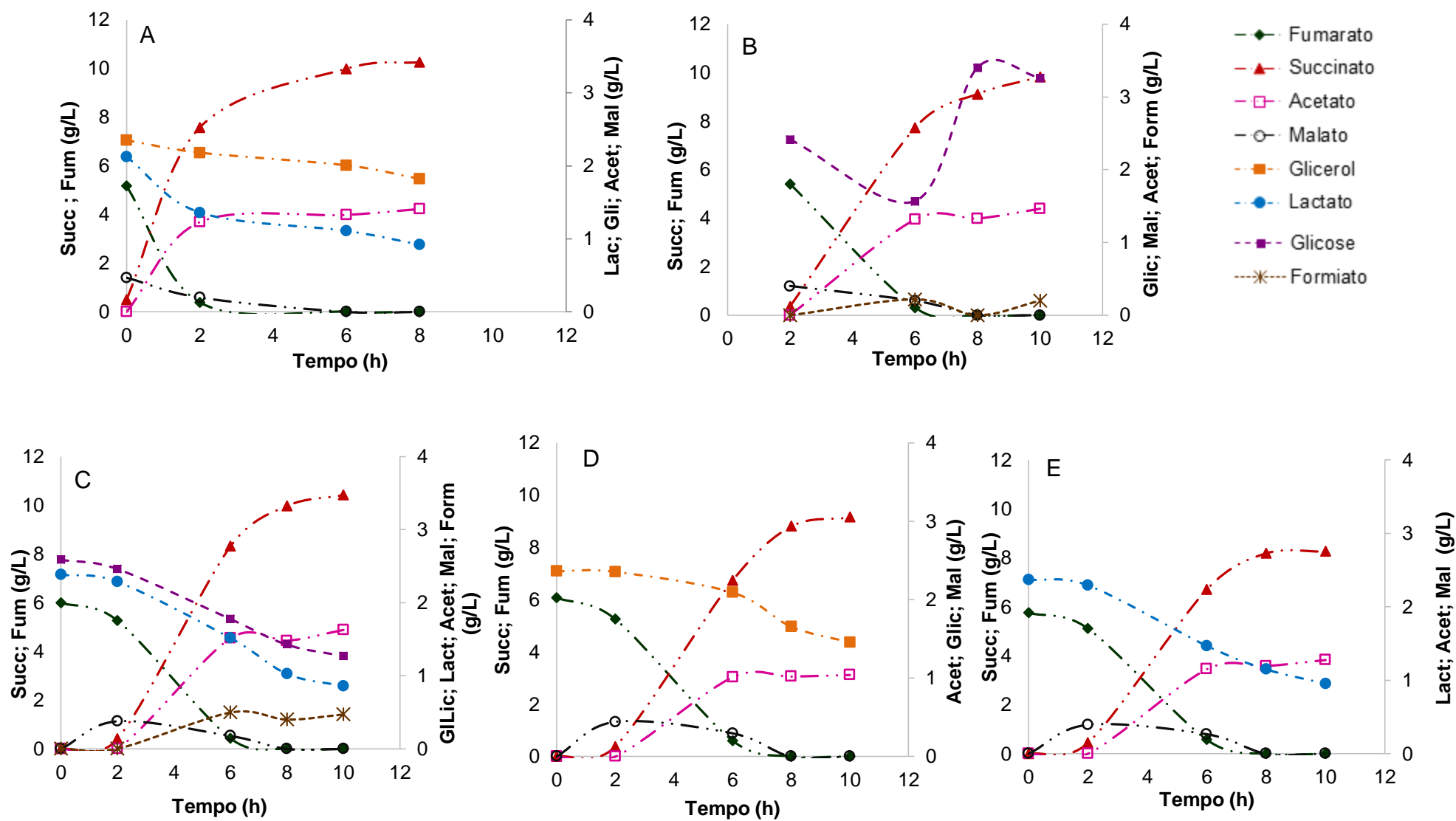


Figura 24 – Cinética de produção de ácidos e consumo de fumarato de sódio em diferentes fontes carbono

O ensaio no qual foi utilizado glicose e lactato de sódio como fontes de carbono (C), mostrou um perfil de consumo similar ao do controle (A) com glicerol e lactato de sódio. No ensaio realizado somente com a glicose como fonte de carbono (B), um perfil peculiar foi verificado, com consumo expressivo de glicose até a sexta hora de cultivo, chegando a uma concentração de 1,5 g/L, e a partir deste momento em diante, houve o aumento na concentração de glicose no meio de cultura, para 3,0 g/L. Othman et al. (2014) em seus estudos com *Hi*, utilizando meio definido e na presença de glicose como fonte de carbono verificou o consumo deste em um primeiro momento e a sua formação posteriormente indicando a possibilidade de estar ocorrendo a gliconeogênese. Nos ensaios A - E apresentados, lactato de sódio foi o substrato preferencialmente usado por *Hib*, e succinato o produto principal gerado quando utilizado fumarato de sódio como acceptor final de elétrons.

A preferência de *Hib* por lactato pode ser explicado em como a bactéria utiliza cada um desses substratos. Lactato participa do metabolismo de *Hib* pela via glicolítica, através de sua conversão à piruvato pela enzima lactato desidrogenase NAD-dependente, acarretando na formação de acetil-CoA (KEGG, 2015), como mostra a Figura 25. Após redução à piruvato poderá ocorrer a gliconeogênese até a formação de glicose-6-fosfato (G6P), produzindo os bioprecursores necessários para o microrganismo. Othman (2014) demonstrou que em condições microaerofílicas e anaeróbicas, há um aumento da expressão da lactato desidrogenase pelo *Hi*. Essa enzima apresenta papel importante na respiração celular, pois durante a aerobiose, a degradação de glicose formando acetato como produto majoritário via EMP, gera NADH que pode ser reoxidado na C.T.e pelo citocromo *bd* oxidase. Quando o oxigênio se torna limitante, ocorre uma mudança no metabolismo e expressão da enzima PFL produzindo formiato como produto da degradação do piruvato, sem formação de NADH. Para que a piruvato desidrogenase continue sendo a principal enzima para degradação de piruvato e geração de NADH, este deve ser consumido via lactato desidrogenase e por respiração via fumarato.

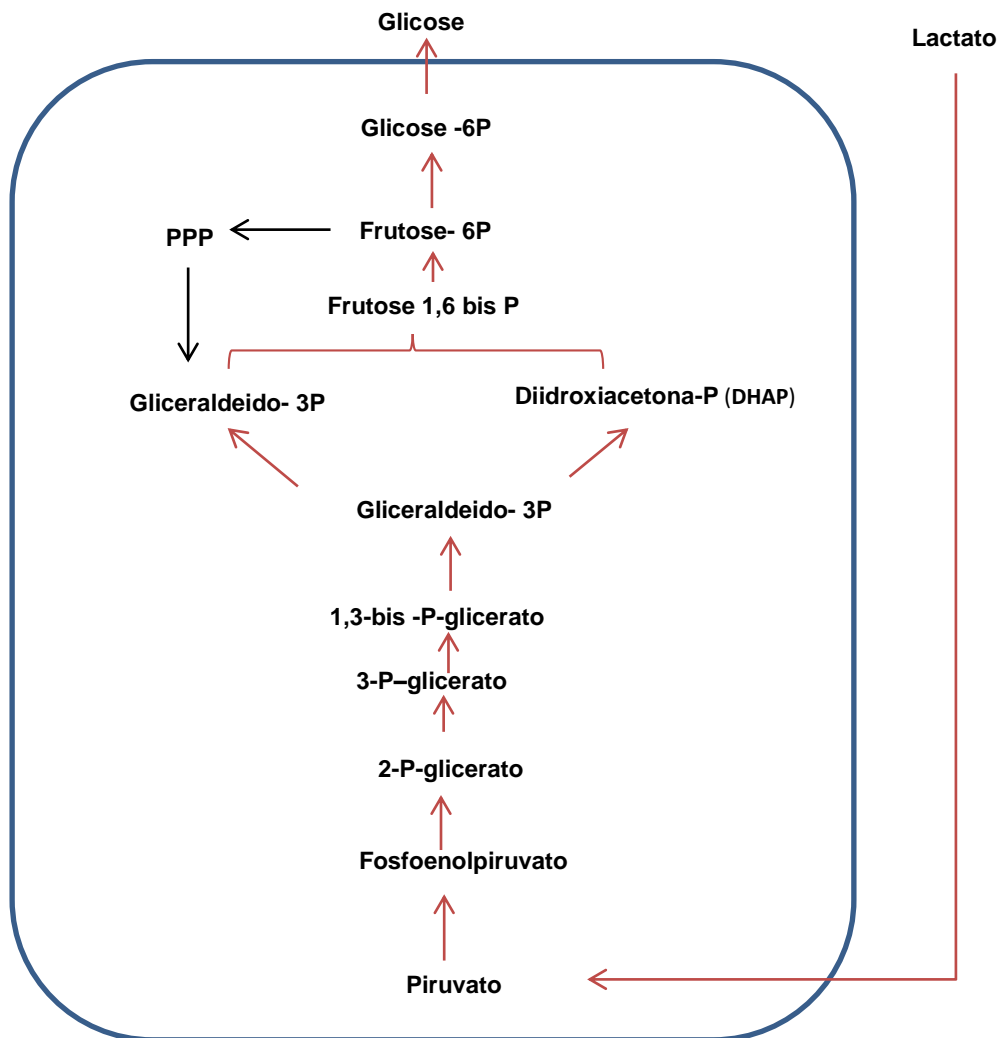


Figura 25 - Gliconeogênese em célula bacteriana na presença de lactato.
(Adaptado de BARBOSA; TORRES, 1999).

Há relatos na literatura relacionado o lactato como um importante fator para a virulência de patógenos como *Neisseria meningitidis*, também invasor da nasofaringe humana e capaz de produzir doenças invasivas de importância clínica. Está envolvido na formação de ácido siálico, grupo de carboidrato constituinte do LOS, garantindo resistência do microrganismo contra o sistema complemento do hospedeiro, mostrado na Figura 26 (ERWIN et al., 2005; WONG; AKERLEY, 2012). Kuratana (1991) observou que em Hib, somado ao aumento de LOS, a mistura de lactato com cálcio no meio de cultura está associada ao aumento da produção de PRP, outro importante fator de virulência. Além disso, lactato é uma fonte de carbono abundante para a

bactéria, encontrado em mucosas, muco, corrente sanguínea e na saliva, principalmente na forma do enantiômero - L-lactato (KURATANA; ANDERSON, 1991).

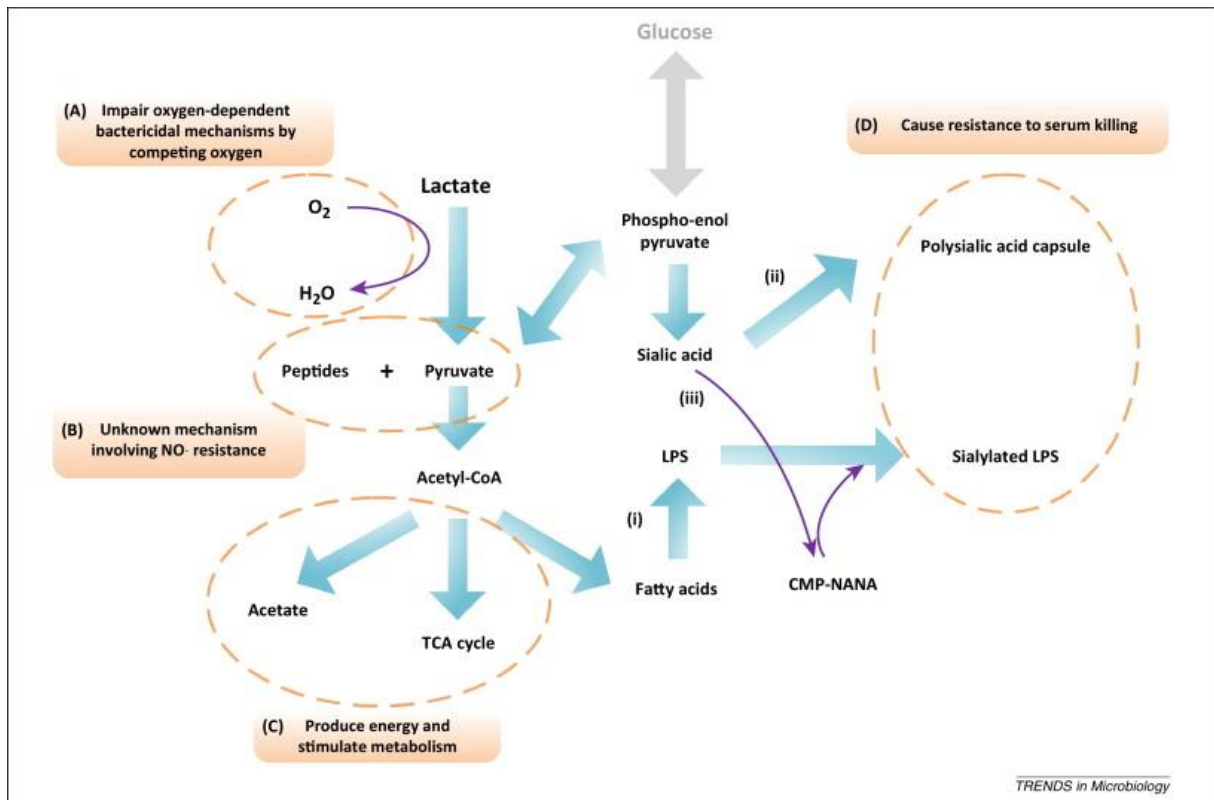


Figura 26 - Mecanismo de formação de ácido siálico através do lactato

(JIANG; TIKHOMIROVA; KIDD, 2014).

O glicerol entra na célula por difusão facilitada e pela ação da enzima glicerol quinase, sendo convertido a glicerol-3-fosfato (G3P) e então pode ser convertido a diidroxiacetona (DHA), conforme ilustra a Figura 27. Essa conversão ocorre por um *operon* no qual expressa duas enzimas de respiração presentes na membrana da célula, a G3P desidrogenase aeróbica (gene *glpD*), sendo ativa na presença de oxigênio e a G3P desidrogenase anaeróbica (gene *glpACB*), expressa na presença de outros aceptores de elétrons diferentes de oxigênio, como nitrato e fumarato (DHARMADI.; MURARKA; GONZALES, 2007). A DHA é fosforilada pela enzima diidroxiacetona quinase para diidroxiacetona fosfato (DHAP) e pode entrar na via glicolítica quando convertido à gliceraldeído-3-fosfato (SCHRYVERS; WEINER, 1981). Entretanto, no caso do glicerol a gliconeogênese é parcial, pois sua entrada é feita a partir do G3P (BARBOSA; TORRES, 1999).

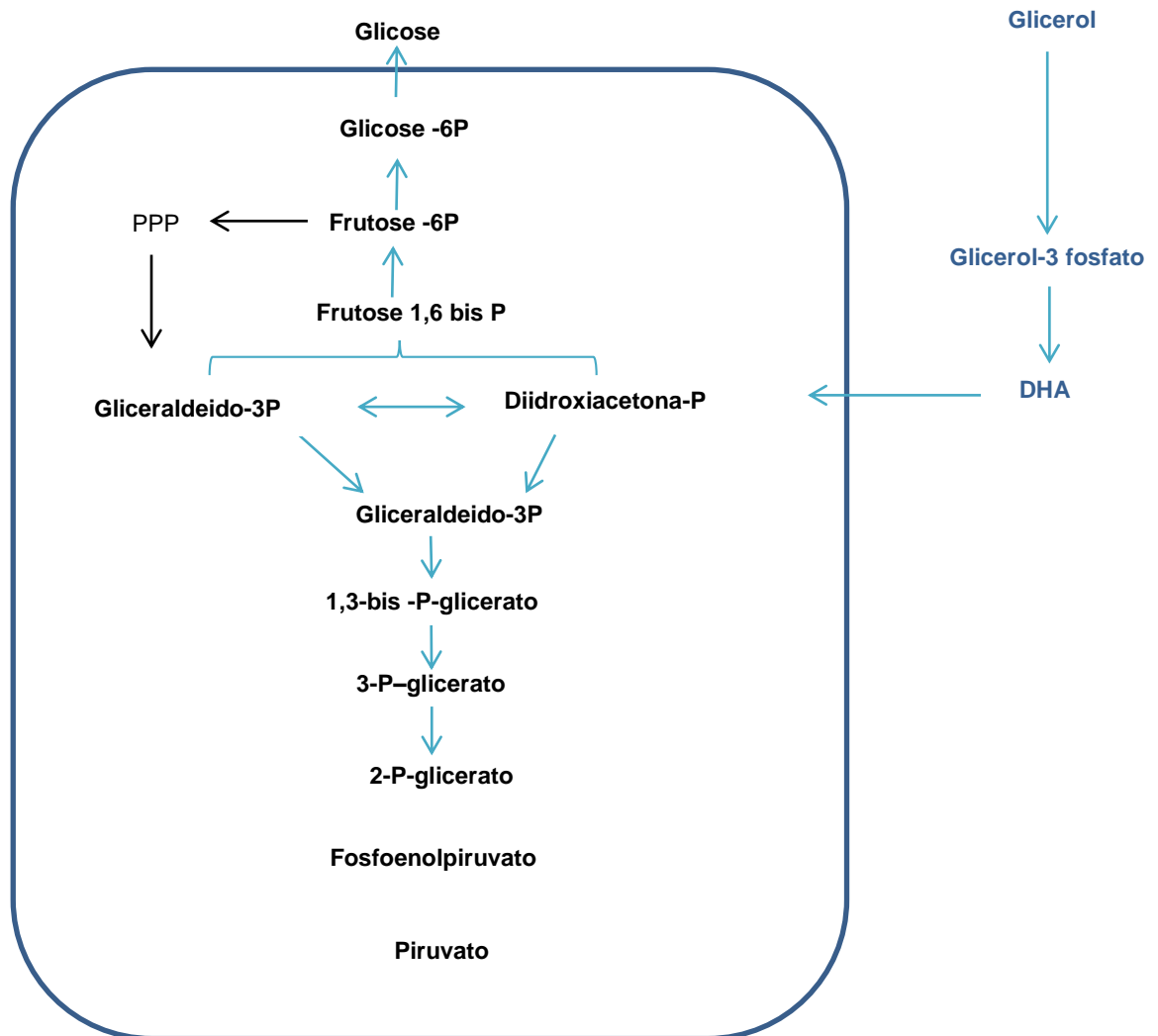


Figura 27 - Via de entrada de glicerol na célula bacteriana.
(Adaptado de BARBOSA; TORRES, 1999).

A glicose é o composto com maior disponibilidade e abundância na natureza, apresentando-se, principalmente, na sua forma polimerizada (amido e celulose). Sendo assim, esse açúcar é utilizado como fonte de carbono principal por muitas bactérias, que oxidam a molécula de glicose a gás carbônico, com produção de ATP e redução da coenzima NADP (BARBOSA; TORRES, 1999).

Como apresentado no item 3.1, Hib utiliza preferencialmente a via glicolítica para degradação de monossacarídeos, como a glicose, e possui todas as enzimas necessárias para a oxidação da molécula de glicose a piruvato, ilustrada na Figura 28. O sistema mais conhecido que leva a molécula de glicose para dentro da célula

bacteriana, é o fosfoenolpiruvato (PEP): carboidrato-fosfotransferase (PTS system), no qual a molécula de açúcar é quimicamente transformada através de fosforilação e assim, utilizada pela célula (KOTRBA et al., 2001). Esse sistema é formado por cinco enzimas que são fosforiladas e desfosforiladas alternadamente, ocasionando uma cascata de reação e assim, a glicose é enviada ao transportador de célula, denominado Enzima II, que efetivamente fosforila a glicose. O sistema PTS é crucial para a entrada imediata da molécula de glicose na via glicolítica, sendo fosforilada a glicose-6-fosfato (KOTRBA et al., 2001; POSTMA et al., 1993).

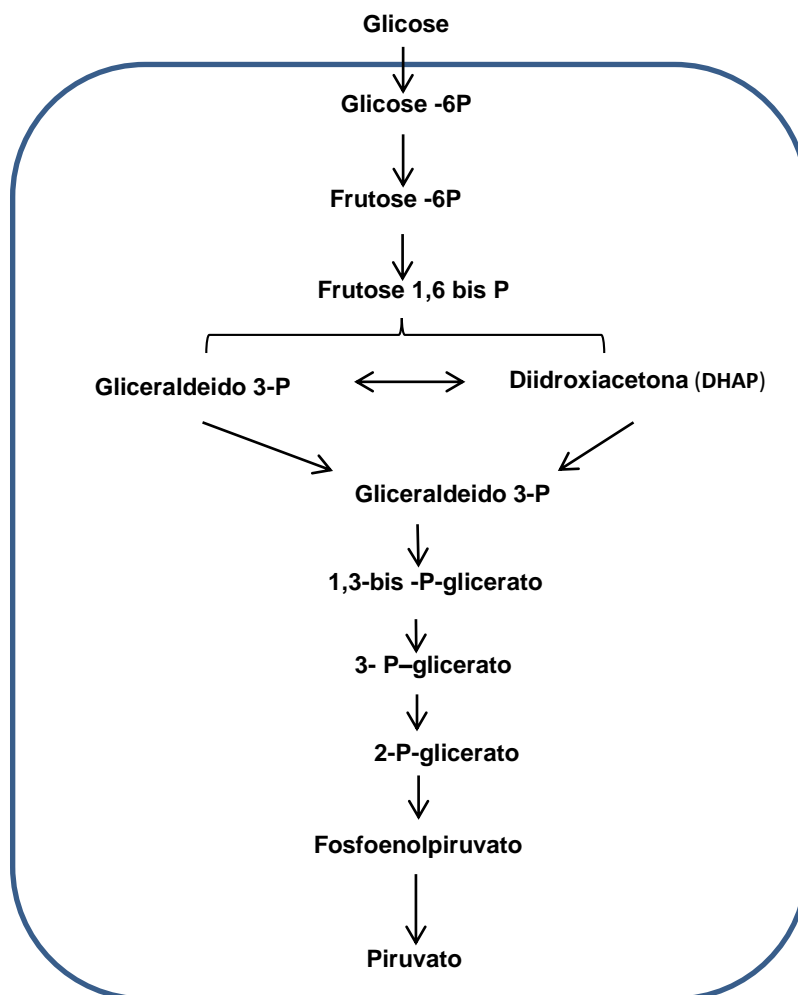


Figura 28 - Via de entrada de glicose na célula bacteriana.
(Adaptado de BARBOSA; TORRES, 1999).

Como em presença de glicose não resultou em uma diferenciação significativa no perfil cinético de crescimento do Hib quando comparado com os substratos utilizados no meio controle, para os ensaios em biorreator foram mantidos a composição do meio MD, contendo glicerol e lactato.

5.3 *Cultivos em biorreator*

Para os cultivos em biorreator, foram considerados os aceptores DMSO e fumarato de sódio em meio MD. Nesses ensaios, os parâmetros como temperatura, agitação e pH são controlados, permitindo adequar melhor as condições ideais para o crescimento da bactéria. Ensaios preliminares foram realizados com DMSO, entretanto o fato de não ter uma metodologia de quantificação ainda estabelecida, os parâmetros avaliados foram limitados. O fumarato de sódio como acceptor de elétron foi mais profundamente estudado, variando a condição de cultivo desde anaerobiose à aerobiose.

5.3.2 DMSO como acceptor de elétrons em anaerobiose

Para o estudo do cultivo em anaerobiose, realizou-se inicialmente ensaio para garantir a manutenção da atmosfera inerte no interior do biorreator. Foram testadas três maneiras, a primeira com introdução submersa do gás nitrogênio diretamente no meio de cultivo; a segunda com a introdução do gás nitrogênio pela superfície do meio de cultura; e a terceira maneira, através da remoção de oxigênio do meio borbulhando nitrogênio antes da inoculação e durante o cultivo, sem introdução de gás. Como pode ser visto na Figura 29, não houve diferença no perfil de crescimento nas três maneiras de manter a atmosfera inerte e atingiram crescimento celular com DO_{540nm} ao redor de 1,5 no final de 10 horas de cultivo. Para dar continuidade aos ensaios, a introdução de nitrogênio pela superfície foi a forma escolhida.

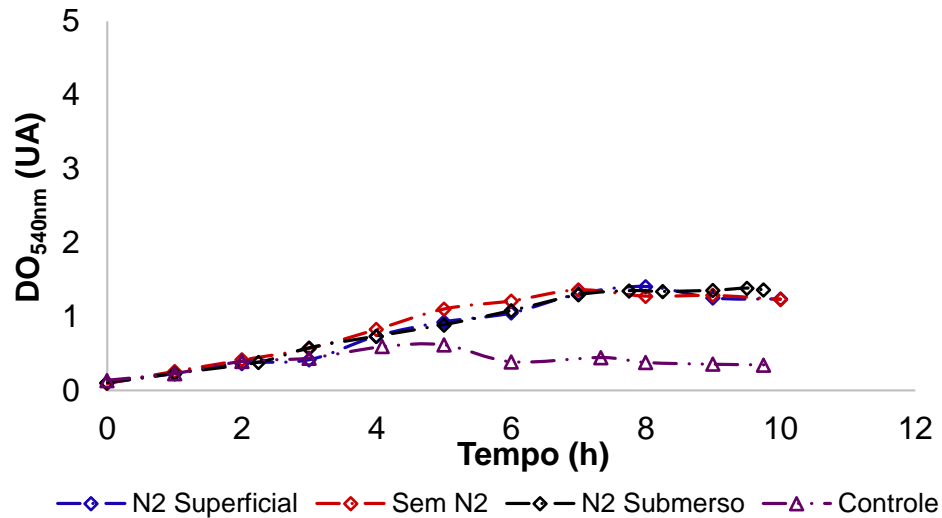


Figura 29 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib na presença DMSO em diferentes maneiras de manter a atmosfera inerte.

A formação de metabólitos ácidos e o consumo dos substratos foi analisada nas amostras do cultivo de Hib em presença de DMSO no qual a introdução de nitrogênio foi superficial (Figura 30). É possível verificar que o consumo dos substratos ao longo do cultivo ocorreu de forma lenta e sem grande variação na concentração. A formação de metabólitos foi principalmente de ácido succínico (2,0 g/L) e em menor concentração, de ácido acético (0,9 g/L). A produção de PRP obteve como média de concentração 40 mg/L.

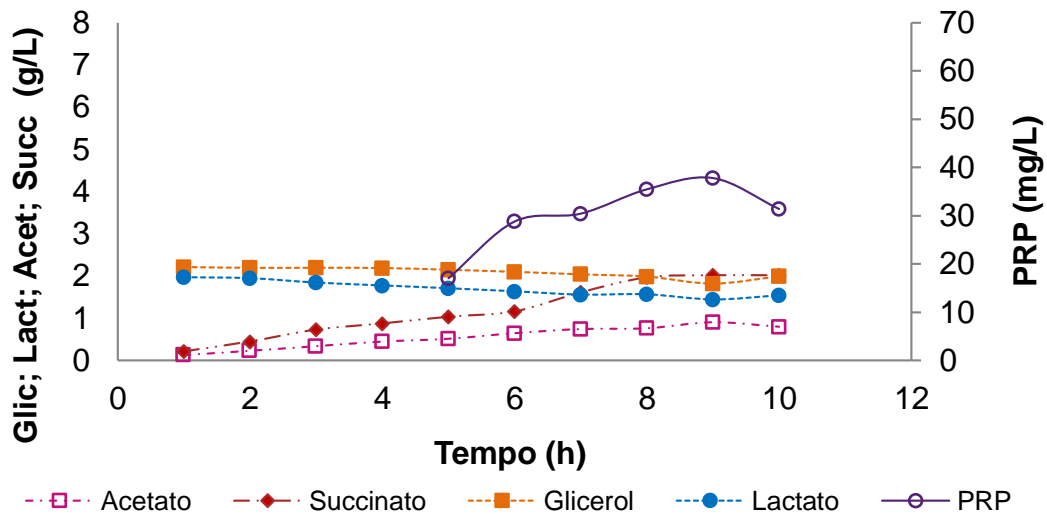


Figura 30 – Cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP, e consumo da fonte de carbono na presença de DMSO como aceptor de elétrons

5.3.3 Fumarato de sódio como acceptor de elétrons em anaerobiose

Para o cultivo de Hib em presença de fumarato de sódio como acceptor final de elétrons em anaerobiose, foi verificado a forma de manter a atmosfera inerte no biorreator da mesma maneira como com o DMSO. Como ilustrado na Figura 31 abaixo, é possível verificar que nas primeiras 6 horas de cultivo o perfil cinético de crescimento é muito similar, entretanto, uma pequena diferença foi observada após esse período, sendo por meio de aeração superficial ligeiramente maior a DO_{540nm} atingindo valor de 1,5.

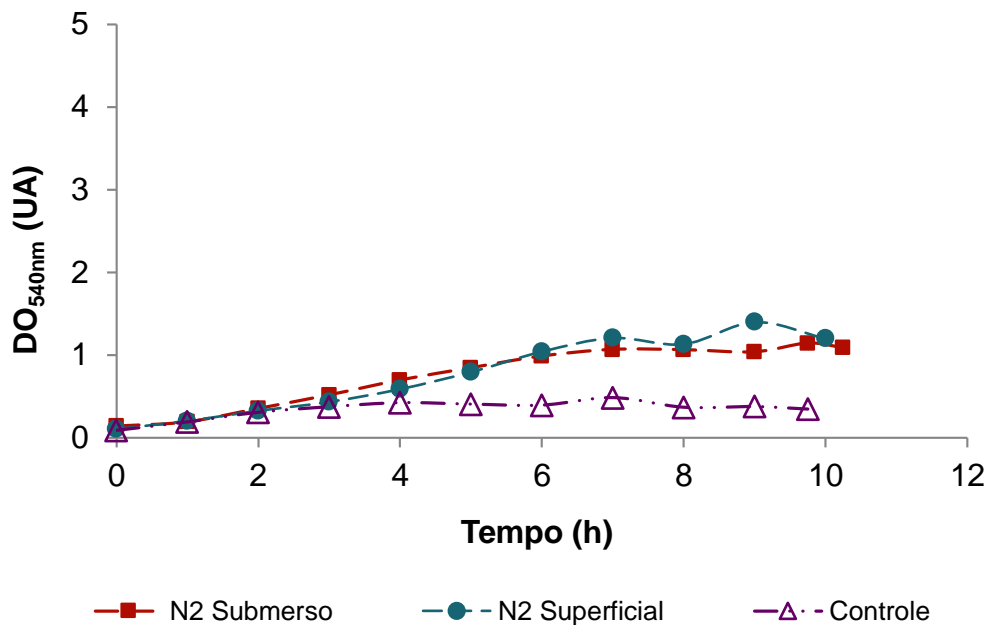


Figura 31 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib na presença de fumarato de sódio em diferentes maneiras para manter a atmosfera inerte.

Em relação ao consumo das fontes de carbono, como mostra a Figura 32, tanto o lactato de sódio quanto o glicerol não demonstraram um consumo expressivo ao longo do cultivo, como ocorreu com DMSO como acceptor de elétrons. Já a Figura 33 mostra o consumo do acceptor e a formação de metabólitos e PRP. Fumarato de sódio foi totalmente consumido a partir da sexta hora de cultivo. Entre os metabólitos produzidos, succinato foi o produto principal, com concentração de 5,91 g/L, seguido de acetato (0,82 g/L) e por fim, malato, produzido em menor quantidade (0,73g/L), e totalmente consumido

a partir da quinta hora de cultivo. A formação de PRP por Hib variou de 13 mg/L, encontrada na quinta hora de cultivo, até 27 mg/L, na última hora de cultivo.

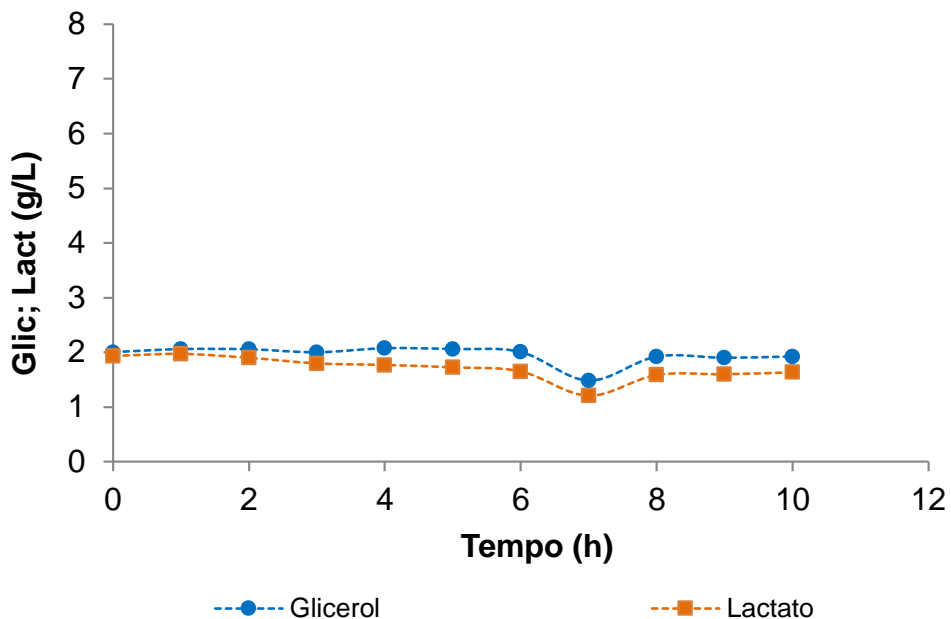


Figura 32 - Consumo das fontes de carbono por Hib, com fumarato de sódio como acceptor de elétrons.

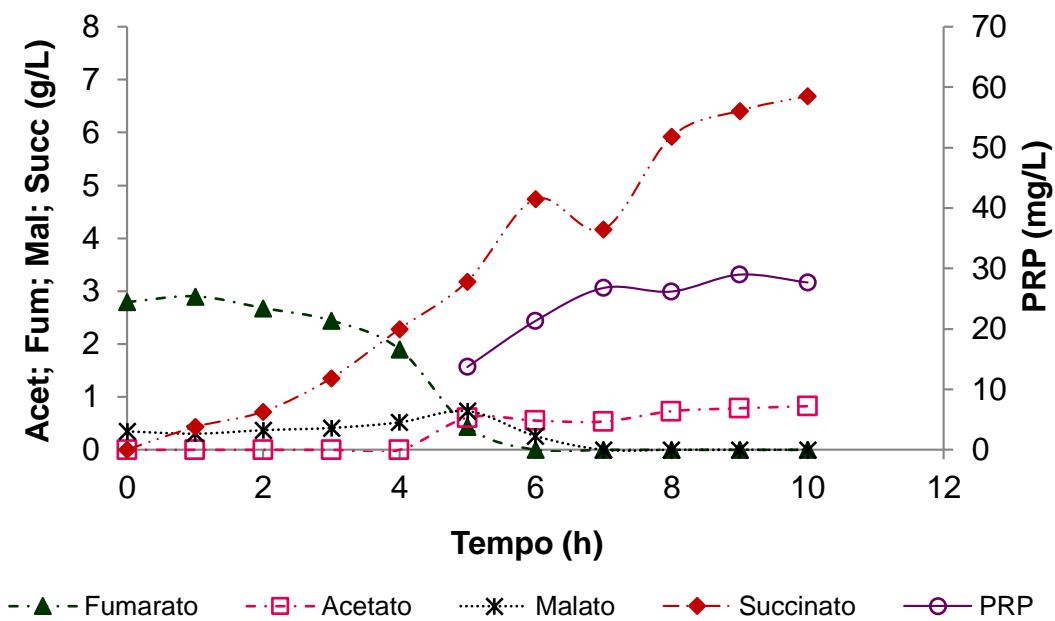


Figura 33 – Cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP por Hib, com fumarato de sódio como acceptor de elétrons.

5.3.3.1 Fumarato de sódio como aceptor final de elétrons em diferentes condições de aeração

Os ensaios realizados na presença de fumarato de sódio foram realizados com o propósito de estudar o crescimento e o metabolismo de Hib em diferentes ambientes de oxigenação. A mudança da condição ambiental no qual ele está inserido foi para avaliar o metabolismo da bactéria, mimetizando as condições em que ela se encontra na natureza como, por exemplo, a transição de Hib por diferentes nichos no hospedeiro, desde aqueles altamente oxigenados (como pulmões e meninges) até a sua transição para outros com limitação na disponibilidade de oxigênio (como ouvido médio e corrente sanguínea). Para isso foram realizados os cultivos em diferentes condições: 1 - cultivo em aerobiose, sem aceptor foi realizado como controle; 2 - aerobiose-anaerobiose com troca brusca do oxigênio para o nitrogênio. Nesta condição, iniciou-se o cultivo em aerobiose sem adição de aceptor e a partir do momento em que a DO_{540nm} atingiu 3,0, próximo do meio da fase exponencial, foi realizada a troca do gás oxigênio (ar comprimido) para nitrogênio e neste momento, adicionou-se também o aceptor de elétron (fumarato de sódio); 3 - Aerobiose-anaerobiose com troca gradativa dos gases. Este ensaio foi realizado como o anterior sendo diferenciado na forma de realizar a troca dos gases que foi realizado de maneira gradual e o fumarato de sódio foi adicionado desde o início do cultivo. 4 - Aerobiose em presença de fumarato de sódio. 5 - Cultivo em anaerobiose, sem aceptor, usado como controle, e descrito nos itens 5.2.1 e 5.2.2. A Figura 34 mostra o perfil de crescimento celular de Hib do controle, que apresentou uma DO_{540nm} de 5,03.

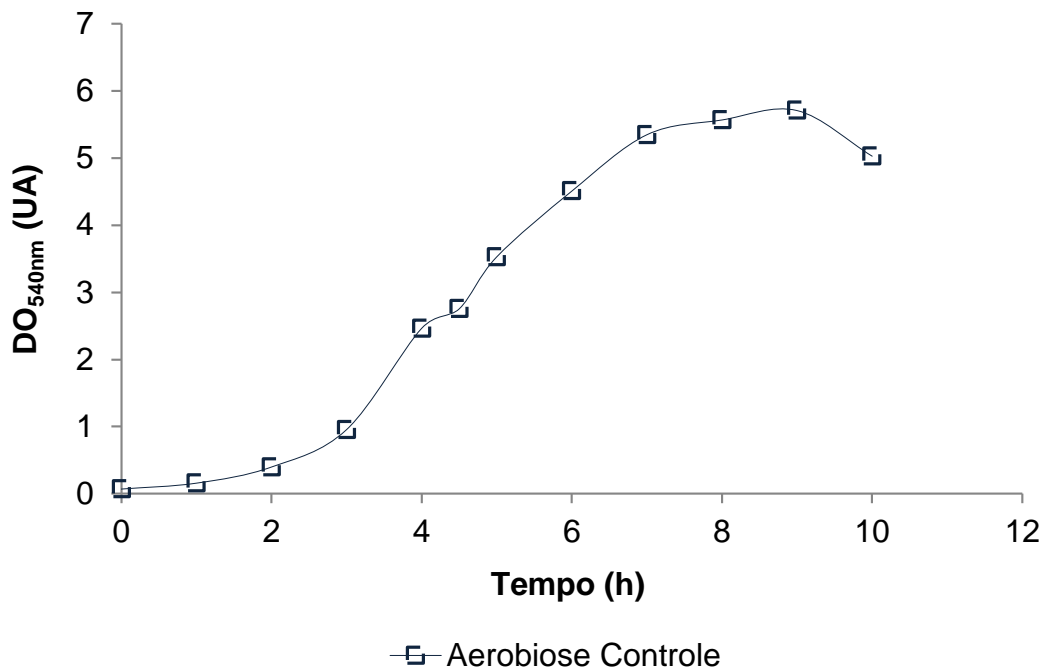


Figura 34 - Cinética de crescimento de Hib em aerobiose (controle).

Na Figura 35, pode ser observado que a partir da sétima hora de cultivo, lactato de sódio foi totalmente consumido e somente dessa forma, inicia-se o consumo de glicerol de modo mais expressivo, até seu esgotamento, na décima hora. Acetato foi o principal metabólito gerado, com 3,31 g/L. Em relação a produção de PRP, a concentração foi aumentando no decorrer do cultivo, variando sua concentração de 36 mg/L na quinta hora até 140 mg/L na décima hora.

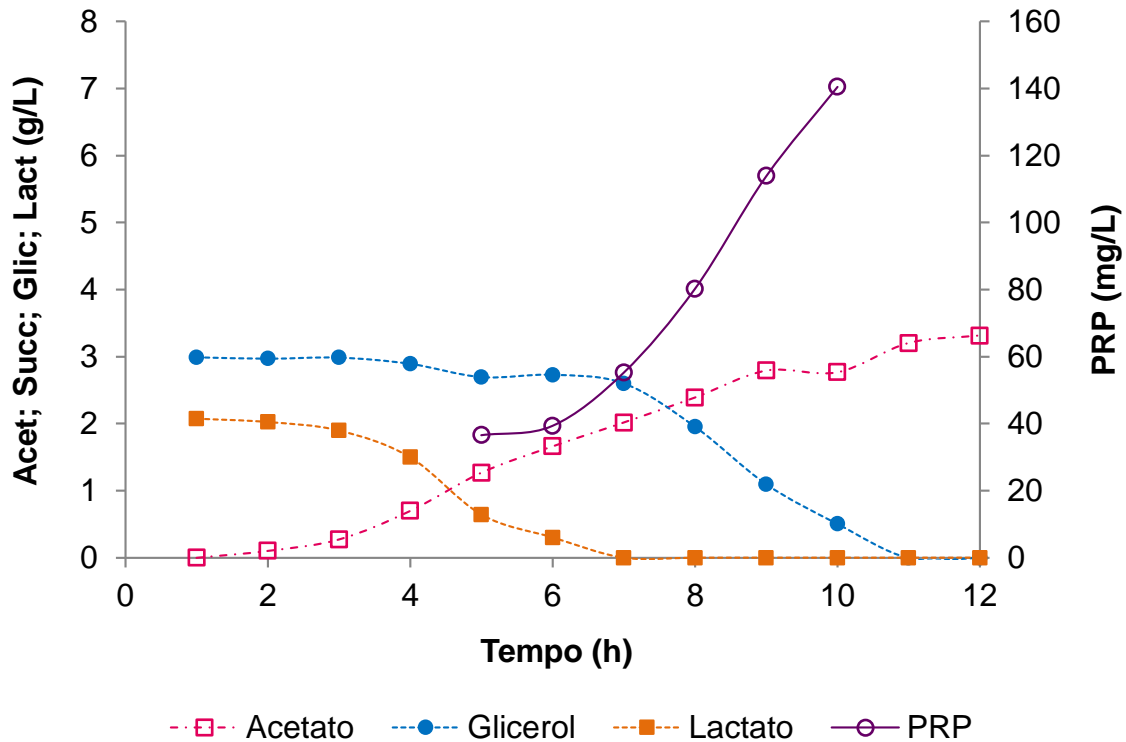


Figura 35 – Cinética de consumo de substratos, produção de ácidos orgânicos e PRP por Hib em aerobiose.

A Figura 36 mostra o perfil de crescimento de Hib na condição aerobiose-anaerobiose (2). Na 4,5h de cultivo, quando a DO_{540nm} atingiu valor de 3,2, foi realizada a troca dos gases. Na quinta hora, a DO_{540nm} foi ao redor de 3,61, atingindo o máximo de crescimento celular. Porém, é possível perceber que ao longo do cultivo, o crescimento diminui e na décima hora, a DO_{540nm} foi de 2,45.

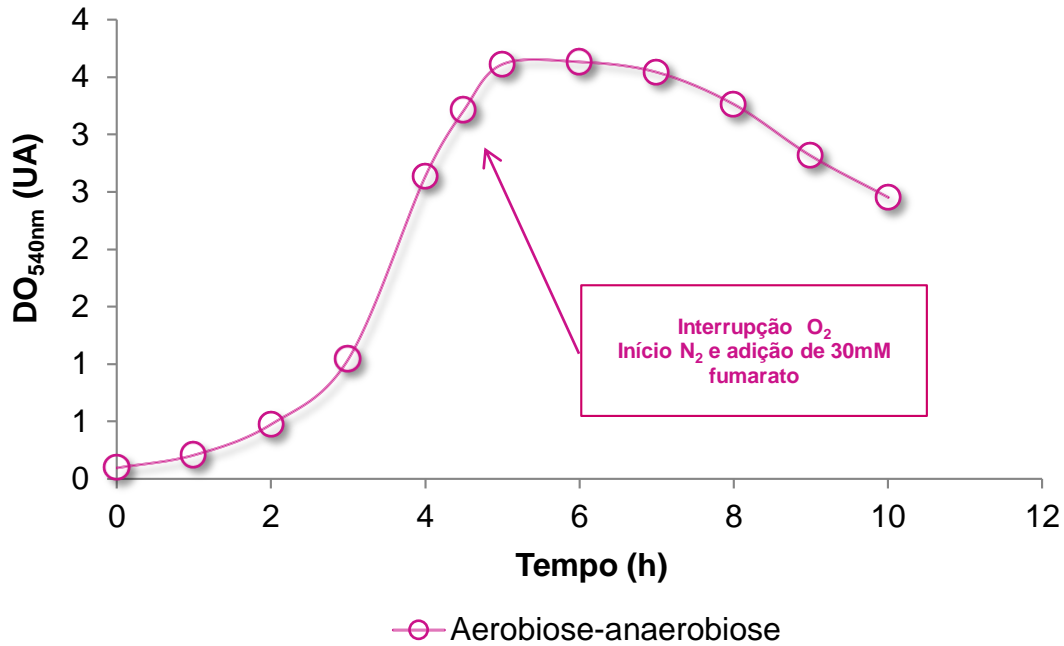


Figura 36 – Cinética de crescimento de Hib com transição de aerobiose para anaerobiose.

O perfil cinético dos metabólitos e PRP produzidos, e consumo dos substratos são observados na Figura 37. Succinato foi o metabolito ácido principal no cultivo de Hib quando o fumarato de sódio é o acceptor de elétrons, com concentração de 4,87 g/L. Contudo, na fase de aerobiose, acetato foi produzido na concentração de 1,49 g/L, chegando a 2,35 g/L, após a introdução de nitrogênio, na 4,5h de cultivo, e manteve-se nesta faixa de concentração até o final do cultivo. Malato foi produzido, chegando a uma concentração de 1,41 g/L, e foi consumido completamente a partir da sétima hora de cultivo. Fumarato de sódio foi adicionado na 4,5 h de cultivo e, provavelmente devido à grande concentração de células geradas quando o cultivo se apresentava em aerobiose, foi completamente consumido e convertido a succinato. Esse último apresentou um aumento na sua concentração a partir da sexta hora, chegando a concentração de 4,31 g/L na oitava hora de cultivo. A produção de PRP foi crescente até a oitava hora, no qual a concentração foi de 57,9 mg/L e manteve-se estável até o final do cultivo, com concentração de 58 mg/L.

Em relação aos substratos, lactato de sódio foi totalmente consumido na sexta hora de cultivo e a partir desse ponto, começou o consumo de glicerol, porém mais lento.

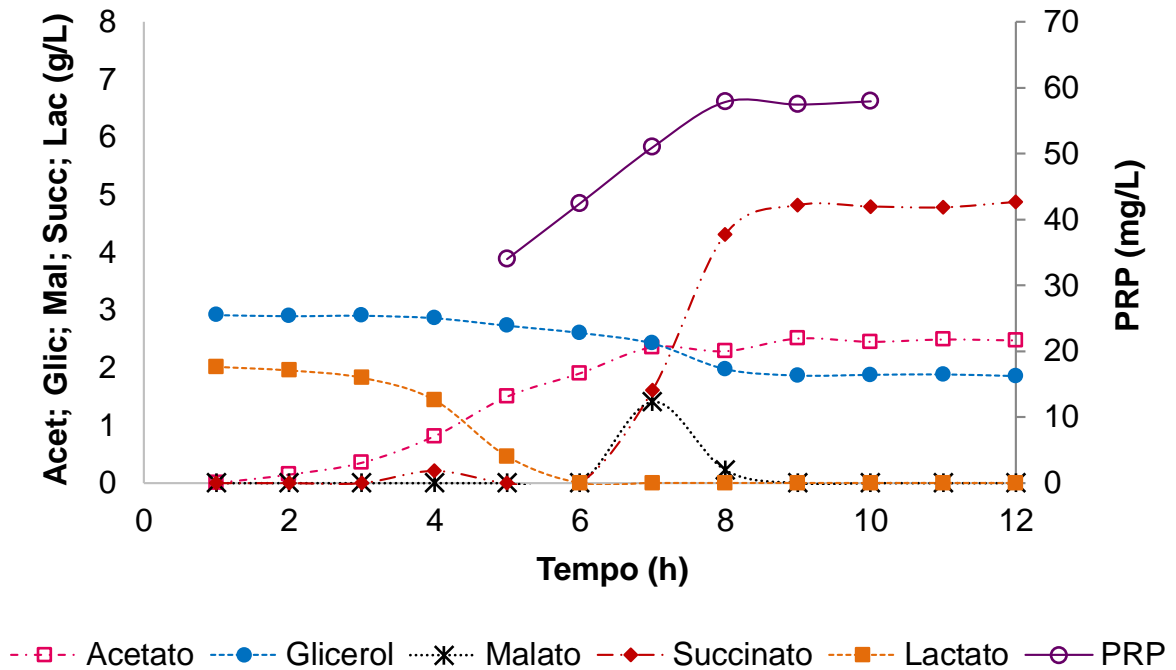


Figura 37 – Perfil cinético de consumo de substrato, produção de ácidos orgânicos e PRP (transição de aerobiose para anaerobiose)

O perfil cinético de crescimento de Hib após a troca de gás oxigênio (ar comprimido) para nitrogênio mostrou uma possível dificuldade de adaptação da bactéria frente à nova condição imposta, para se adaptar às modificações necessárias em seu metabolismo devido a limitação de oxigênio.

Diante deste fato, foi realizado o segundo cultivo com uma nova condição de aeração. Dessa vez, a mudança dos gases foi realizada de maneira gradual. A introdução de nitrogênio foi realizada como descrito para o ensaio anterior, entretanto, com a troca gradual como descrito no item 4.2.3.

O perfil de crescimento de Hib nesta condição de aeração é mostrado na Figura 38. Apesar da troca gradual dos gases e da disponibilidade de fumarato de sódio desde o início do cultivo, a resposta de Hib a essa mudança não teve uma mudança significativa de crescimento em relação a condição anterior. Na sexta hora de cultivo, a DO_{540nm} chegou a 4,17 e, a partir do momento em que alterou para o nitrogênio, foi observada uma queda no perfil de crescimento, com uma DO_{540nm} de 2,09 ao final da décima hora.

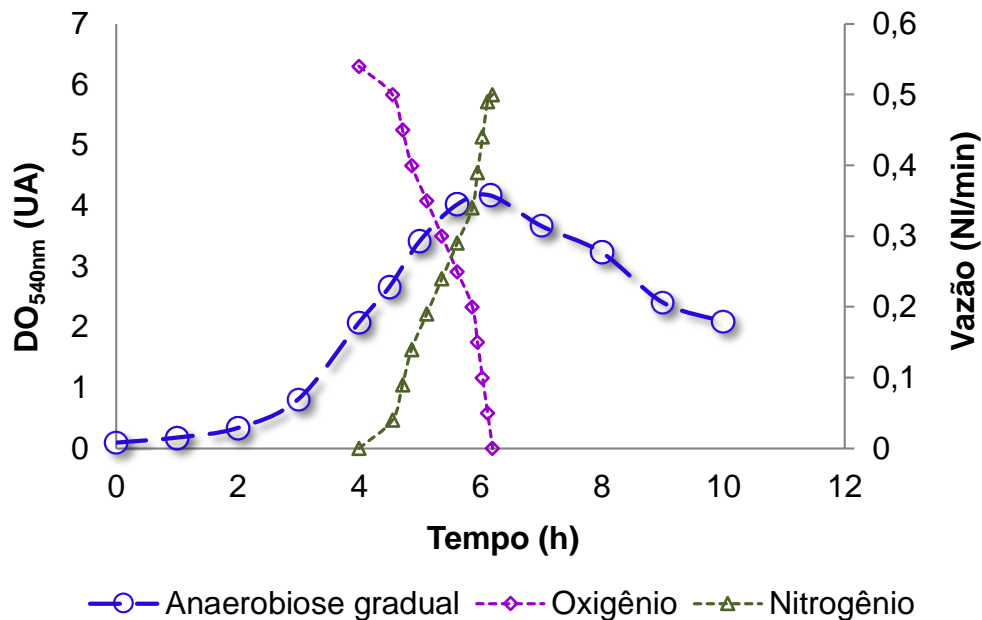


Figura 38 - Perfil cinético de crescimento de Hib em biorreator após troca gradual de oxigênio para nitrogênio.

Como mostra a Figura 39, succinato foi o principal metabólito gerado, chegando a uma concentração de 3,83 g/L, seguido de acetato com concentração de 3,03 g/L, produzido principalmente na fase de aerobiose (0h – 6h). Malato foi produzido com concentração máxima de 1,5 g/L na quinta hora de cultivo e totalmente consumido ao longo do cultivo. Fumarato de sódio foi consumido até seu esgotamento, na sexta hora. O consumo de substratos, demonstrado na Figura 40, mostra que glicerol começou a ser consumido a partir da quarta hora, quando a concentração de lactato de sódio estava abaixo de 0,55 g/L. Na sexta hora de cultivo, foi feita adição de lactato de sódio na concentração inicial do meio MD (2 g/L), mas não refletiu em maior crescimento celular.

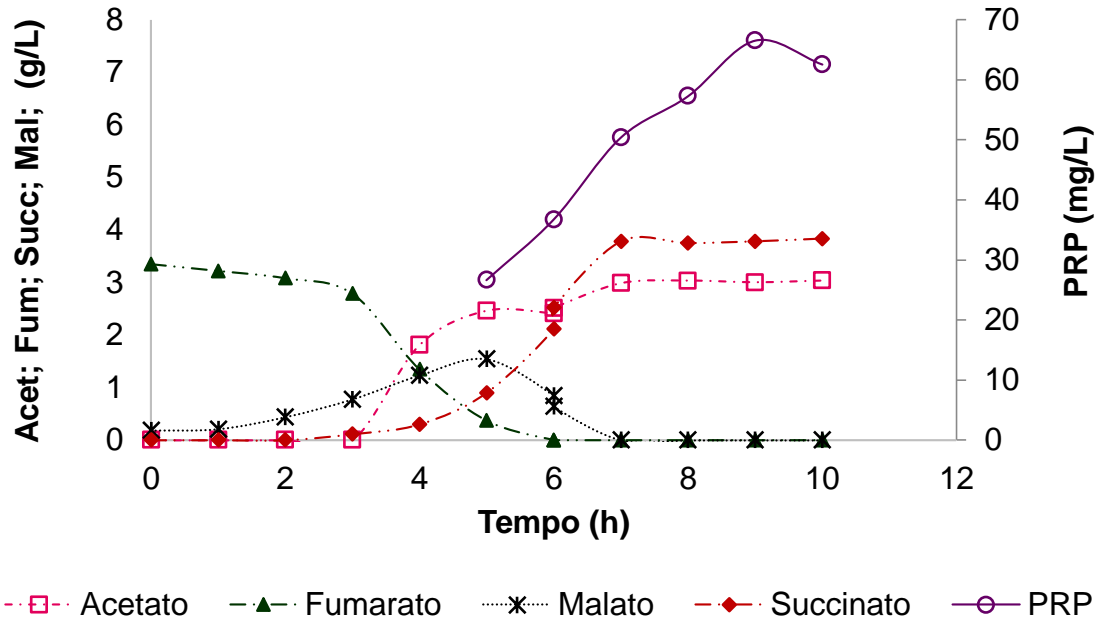


Figura 39 – Perfil da cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP, e consumo de fumarato de sódio

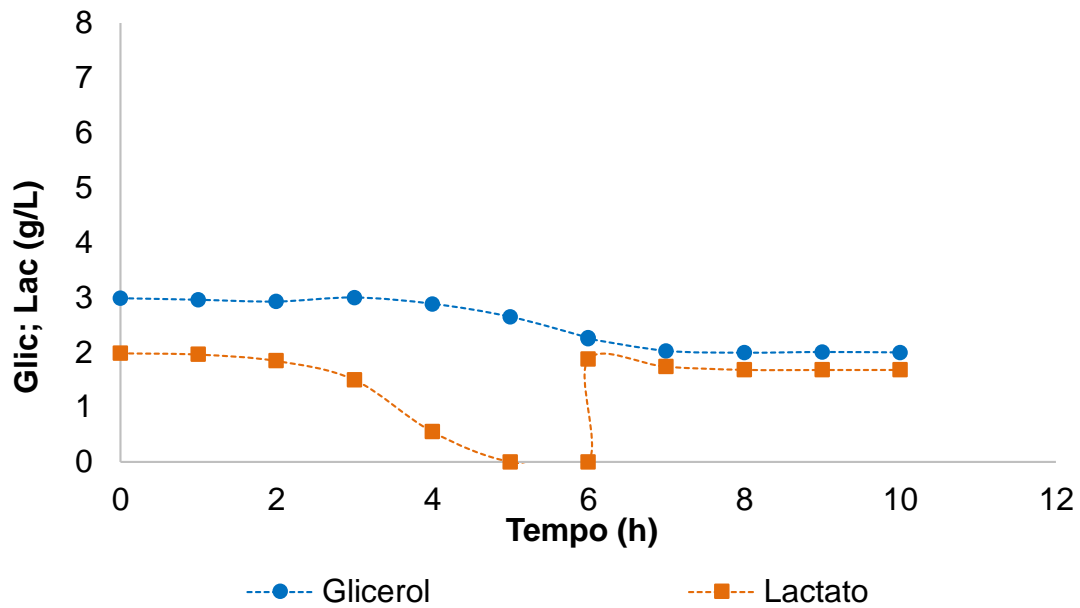


Figura 40 - Consumo de substratos após troca gradual de oxigênio para nitrogênio.

Quando foi adicionado mais lactato de sódio ao meio, fumarato já havia sido totalmente consumido e, sendo assim, a introdução de mais fonte de carbono não iria resultar em maior crescimento, uma vez que o acceptor final de elétrons havia se esgotado.

Emsaio na condição de aerobiose com adição de 30 mM de fumarato de sódio foi realizado para comparar os perfis cinéticos e verificar como o fumarato de sódio seria usado pelo Hib na presença de oxigênio. A Figura 41 mostra o perfil de crescimento de Hib na condição descrita onde na sexta hora, a DO_{540nm} , alcançou valor de 5,09, similar a DO_{540nm} , encontrada no controle (5,03). Porém, a partir da sétima hora, foi atingido um platô, e ao final do cultivo, a DO_{540nm} , foi de 4,85.

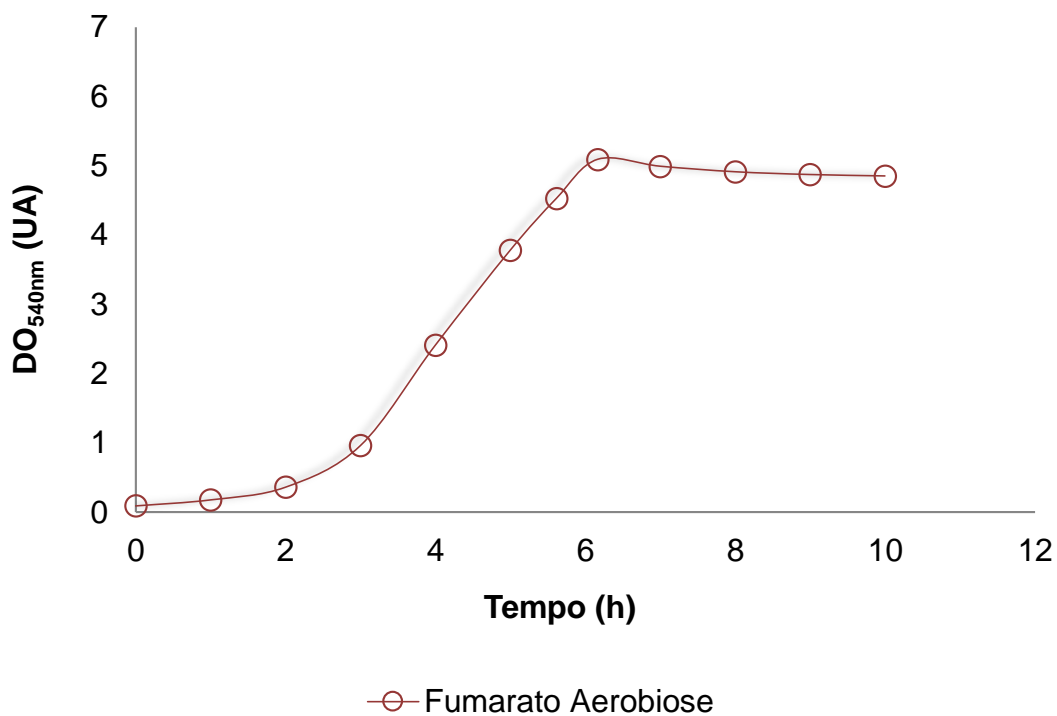


Figura 41 – Cinética de crescimento de Hib em aerobiose em presença de fumarato de sódio.

Em relação à produção de metabólitos e PRP, e consumo de fumarato de sódio, ilustrado na Figura 42, acetato foi o metabólito gerado em maior concentração, 5,95 g/L comum nos cultivos em aerobiose, seguido de succinato com concentração de 2,32 g/L na sétima hora de cultivo, resultado do consumo de fumarato e quando este foi esgotado, o succinato foi sendo consumido ao longo do cultivo. Malato foi produzido na concentração máxima de 1,52 g/L na quinta hora de cultivo e totalmente consumido ao final do cultivo. Diferentemente dos dois ensaios anteriores, succinato foi consumido também e provavelmente gerando acetato até o final do cultivo.

A Figura 43 mostra o perfil de consumo dos substratos presentes no meio de cultura ao longo do cultivo. Glicerol apresentou consumo mais expressivo a partir da quarta hora de cultivo, quando lactato de sódio foi totalmente consumido. Na sexta hora de cultivo, foi adicionado lactato de sódio na concentração inicial do MD (2 g/L) o qual verificado o consumo imediato e esgotado na oitava hora. O fumarato de sódio também foi consumido expressivamente totalmente consumido na sexta hora.

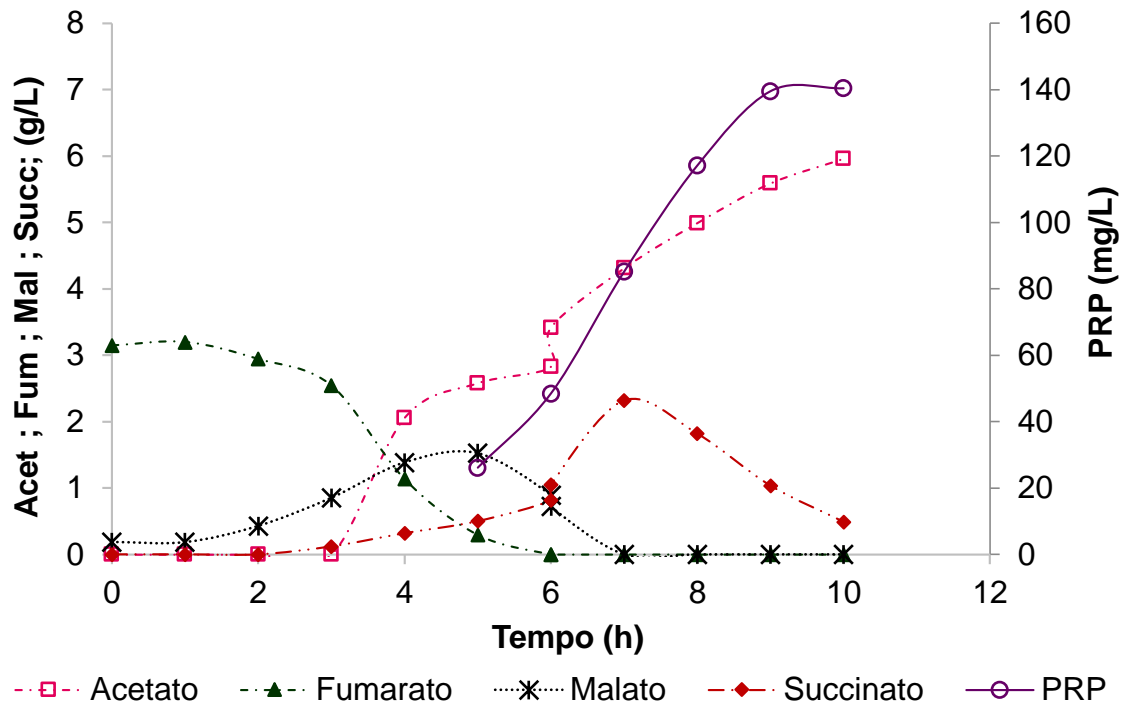


Figura 42 - Cinética de produção de ácidos orgânicos e PRP, e consumo de fumarato de sódio por Hib após cultivo em aerobiose na presença de fumarato de sódio.

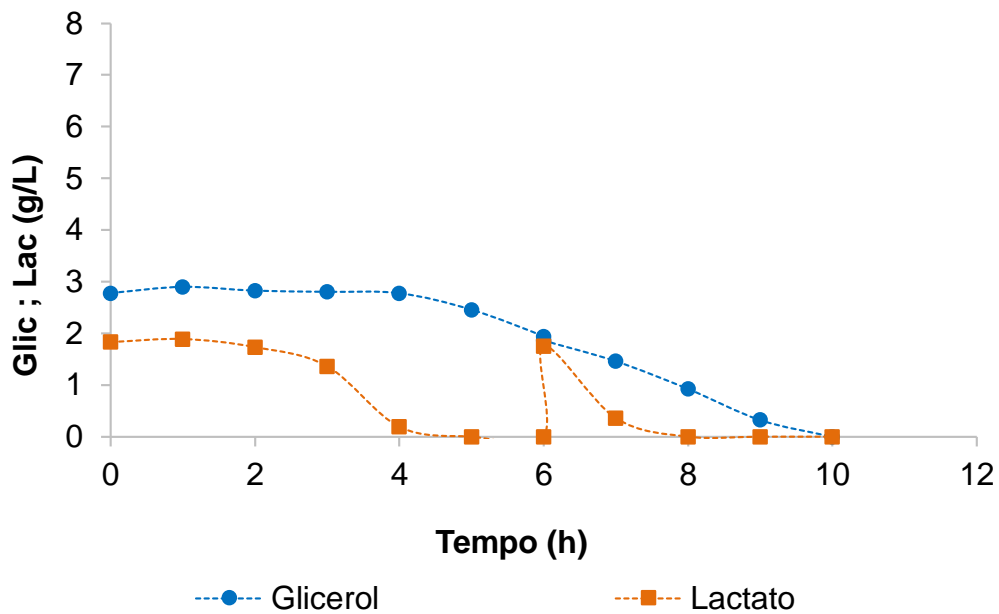


Figura 43 - Consumo de lactato de sódio e glicerol por Hib após cultivo em aerobiose na presença de fumarato de sódio.

A Figura 44 ilustra a comparação entre os perfis de crescimento celular de todos os três ensaios realizados em diferentes condições de aeração, e dois perfis de crescimento de controle (em aerobiose e em anaerobiose). É possível observar que a mudança nas condições de aeração, seja ela de forma abrupta (primeira condição) quanto de forma gradual (segunda condição). A adição de fumarato ao cultivo em aerobiose afetou o crescimento de Hib quando comparado com o controle em aerobiose.

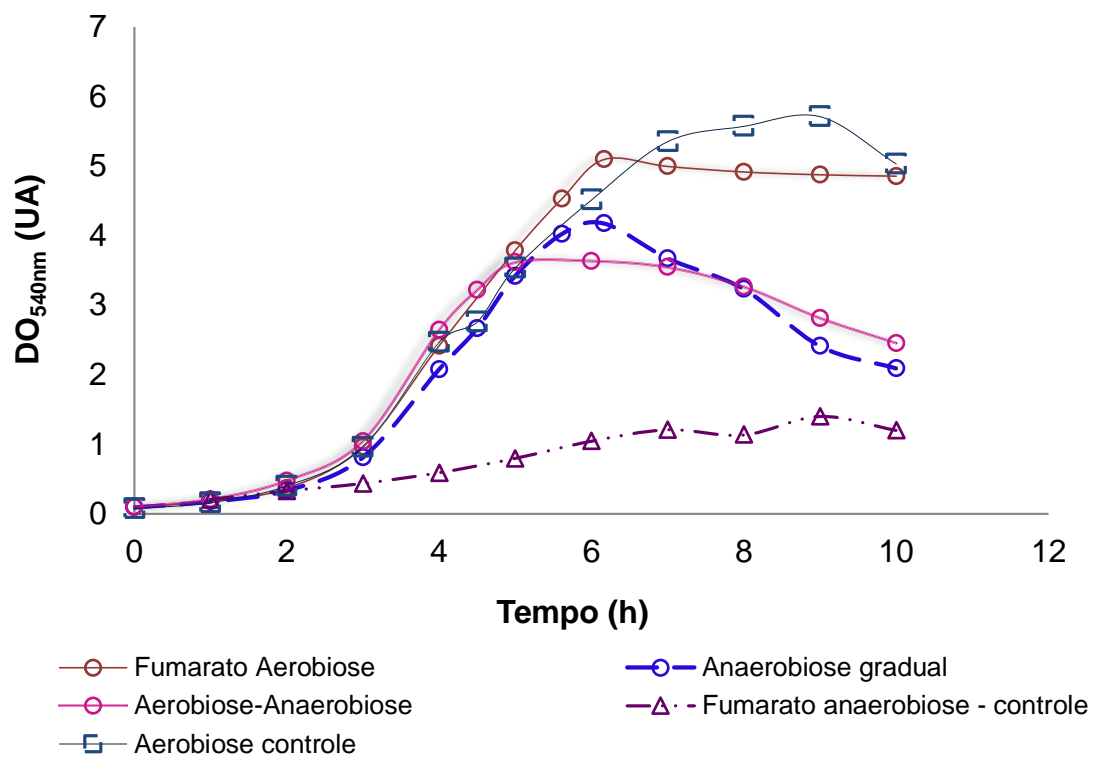


Figura 44 - Comparação dos perfis de crescimento de Hib em diferentes condições de aeração.

Observando os gráficos de consumo de lactato de sódio e glicerol dos ensaios em biorreator anteriormente apresentados, é possível inferir que a presença ou ausência de oxigênio pode determinar o consumo das fontes de carbono. No cultivo em anaerobiose, utilizando DMSO e fumarato de sódio isoladamente como aceptores de elétrons (Figuras 30 e 32, respectivamente), o consumo das fontes de carbono pelo Hib não foi significativo. Tanto lactato de sódio quanto glicerol demonstrou um baixo consumo por Hib ao longo

do cultivo, independentemente do tipo de acceptor presente no meio de cultura. Entretanto, nos cultivos nos quais condição de aeração foi modificada de forma abrupta durante o cultivo, o perfil de consumo de lactato de sódio e glicerol foi diferenciado (Figura 37). O lactato de sódio foi totalmente consumido na sexta hora de cultivo e glicerol foi consumido com maior expressão após o esgotamento do primeiro. Por outro lado, no cultivo no qual a troca de gases foi feita de maneira gradual (Figura 40), foi observado que até a quarta hora de cultivo (aerobiose), o lactato de sódio foi consumido até seu esgotamento e glicerol, então, começou a ser utilizado como fonte de carbono. Após a troca completa para o gás nitrogênio, ocorrida na sexta hora de cultivo, o consumo dos substratos manteve-se sem grandes variações de concentração, em partes devido ao esgotamento do fumarato de sódio como acceptor de elétron, como observado também nos cultivos em anaerobiose.

Por outro lado, nos cultivos em aerobiose na presença de fumarato de sódio (Figura 43) e o controle sem acceptor (Figura 34), tanto o lactato de sódio quanto o glicerol foram consumidos até serem esgotados. Em grande parte, esse consumo mais expressivo deve-se ao fato de que em aerobiose, o crescimento celular é bem superior do que em anaerobiose, além disso, o oxigênio está sendo fornecido continuamente ao longo do cultivo evitando assim a limitação deste como acceptor final de elétrons, fato este que não ocorreu nos cultivos em que o fumarato era acceptor final de elétrons sendo visível a sua limitação. Por outro lado, a entrada de lactato na célula bacteriana é dependente da enzima L-lactato permease, regulada pelo sistema ArcA/B e capaz de programar a célula para a entrada ou não da molécula via controle redox. A repressão ou ativação desta enzima pelo sistema ArcA/B é dependente também da disponibilidade de lactato no meio (LICHTENEGGER et al., 2014). Portanto, o sistema ArcA/B modula a entrada de lactato na célula de acordo com a condição na qual a bactéria se encontra, com excesso ou limitação de oxigênio e a diferença na velocidade de consumo dos substratos apresentados durante os ensaios em anaerobiose, aerobiose e mudança da condição de aerobiose para anaerobiose pode também ter sido influenciada pelo sistema ArcA/B.

A formação de metabólitos ácidos está intimamente relacionada com a fonte de carbono presente no meio de cultura, além da condição de crescimento ao qual é submetida a bactéria e determinam a expressão ou inibição das enzimas participantes

nas vias metabólicas. Nos trabalhos apresentados por Raghunathan e por Othman, ambos realizaram cultivo de *Hi* em diferentes taxas de oxigenação (aerobiose, microaerofilia e anaerobiose), mostraram que, no geral, acetato foi o produto majoritário na respiração aeróbia, enquanto formiato o produto principal em microaerofilia e anaerobiose. Iverson (1999) verificou que o succinato gerado na respiração via fumarato não pode ser usado como substrato energético na ausência de um aceptor com alto poder redox, como oxigênio ou nitrato, acumulando assim no meio (IVERSON et al., 1999) e dessa forma, corroborando com os resultados encontrados quando succinato foi o metabólito formado em maior concentração. Fumarato pode ainda ser formado a partir da arginina, tirosina e aspartato, presentes no meio MD e assim, contribuirão também para produção de succinato na via TCA (KEGG, 2015).

Os principais doadores de elétrons para a fumarato redutase são gerados pela oxidação de formiato, lactato e malato, sendo essa reação catalisada na membrana celular da bactéria. A redução do fumarato só é possível em bactérias que possuem menaquinona como mediadora dos elétrons, como no caso *Hib* e ilustrado na Figura 45 (KRÖGER, 1978). Othman confirmou em seu estudo que a regulação da enzima fumarato redutase é realizada pela proteína FNR, sendo a expressão dessa enzima aumentada em condições anaeróbicas.

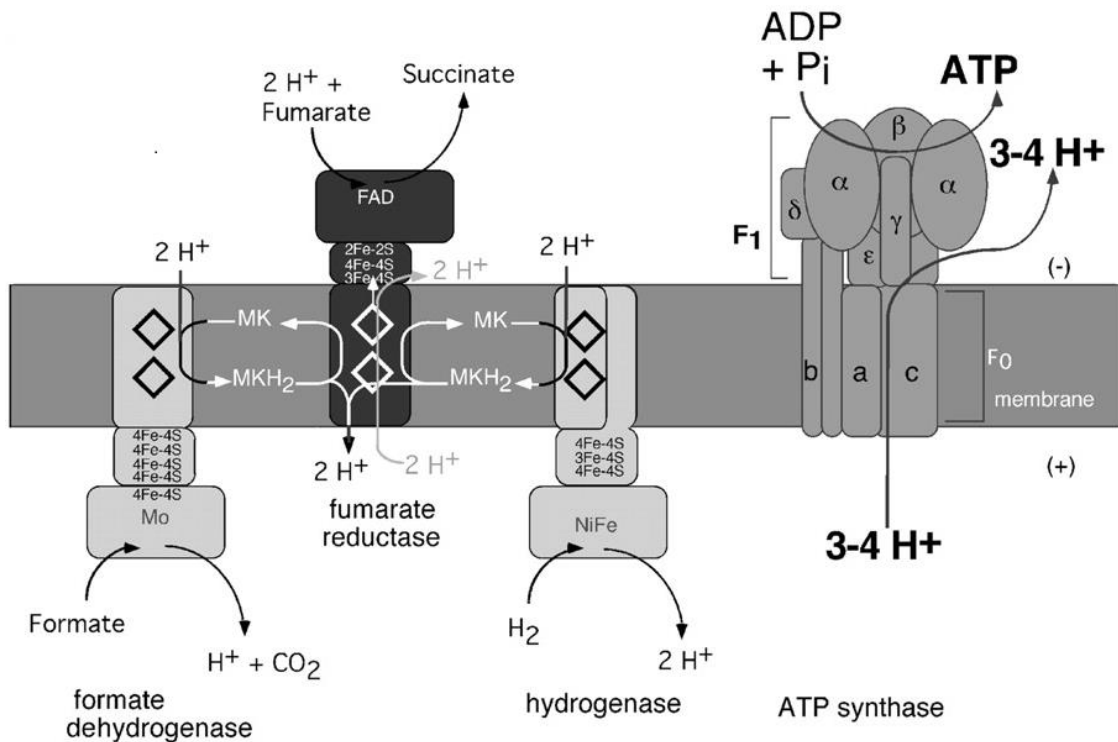


Figura 45 - Mecanismo de redução de fumarato a succinato na cadeia de transporte de elétrons (LANCASTER et al., 2005).

No ensaio em biorreator no qual DMSO foi utilizado como aceptor final de elétrons, houve produção tanto de succinato quanto de acetato. DMSO é um composto sulfurado largamente encontrado em ambiente marinho. Seu produto, DMS, é a forma reduzida natural de enxofre, de maior concentração, presente na atmosfera oriunda a partir da superfície da água do oceano e representa mais de 20% das emissões globais de enxofre (LISS et al., 1997). Não existem relatos na literatura reportando sobre o metabolismo de DMSO em anaerobiose por *Hi* exclusivamente, sendo mais extensamente estudado em enterobactérias como *E. coli*, no qual a redução de DMSO para DMS é usado para identificação desse grupo de bactérias em teste de diagnósticos, e em bactérias fotossintetizantes, como *Rhodospseudomonas capsulata* (ZINDER; BROCK, 1978). É sabido que *Hi* é capaz de crescer em meio contendo DMSO, pois possui o *operon* *DmsABC*, como na *E. coli*, que expressa a enzima DMSO redutase (MCCRINDLE et al., 2005; OTHMAN et al., 2014; RAGHUNATHAN et al., 2004;). Como pode ser observada na Figura 46, esta enzima é composta por três partes: a *DmsA*, parte catalítica que

contém a subunidade de molibdênio, a DmsB formada por poliferrodoxina e responsável pela transferência de elétrons e a parte DmsC, que fica ancorada na membrana plasmática. Assim como a fumarato redutase, essa enzima precisa da menaquinona para transferência de elétrons (WISSENBACH; TERNES; UNDEN, 1992) e está sob regulação da proteína FNR quando oxigênio torna-se limitante (MCCRINDLE et al., 2005).

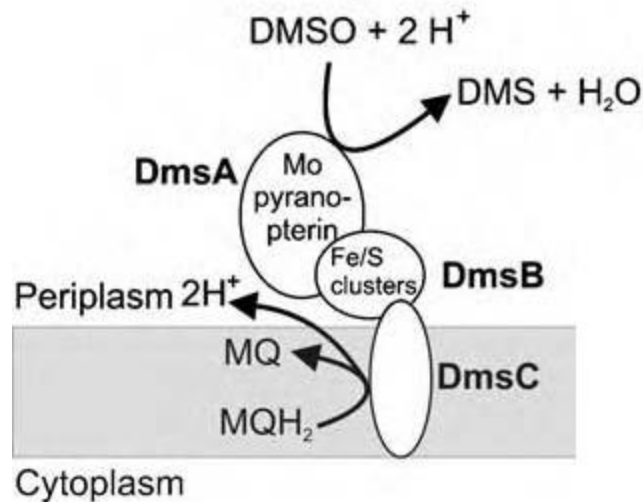


Figura 46 - Representação das enzimas DMSO redutase na membrana plasmática

(MCCRINDLE, 2005).

Malato também integra o TCA, podendo ser produzido a partir do fumarato pela enzima fumarato hidratase, ou a partir do oxaloacetato, pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, ambas as reações reversíveis. Oxaloacetato, por sua vez, pode ser formada a partir do PEP e dos aminoácidos alanina, aspartato e glutamato (TUYAU et al., 1984), todos presentes no meio MD. Malato pode ainda ser produzido a partir do piruvato, formado pela oxidação de carboidratos na via glicolítica; do lactato e dos aminoácidos serina e alanina.

O malato produzido nos ensaios realizados, em biorreator, na presença de fumarato de sódio como aceptor foi baixa, na ordem de 0,5 – 1,5 g/L dependendo da condição submetida e foi rapidamente consumida, podendo ter sido utilizado para formação de outros metabólitos.

Acetato é produto de degradação de Acetil-CoA, através da enzima PD ativa em condições aeróbicas, porém, Raghunathan (2004) verificou em seu estudo *in silico* que a via de produção de acetato a partir de acetil fosfato (acetil-P), pela enzima D-lactato desidrogenase NAD-dependente, está ativa em condições anaeróbicas. Assim sendo, nos ensaios realizados com DMSO como acceptor final de elétrons, pode ter ocorrido a oxidação de lactato e glicerol para gerar acetato.

E além das redutases já descritas, Hi possui a enzima TMAO redutase, responsável pela redução de TMAO a TMA (trimetilamina), e pertencente ao mesmo grupo de molibdoenzimas da DMSO redutase, capaz de usar TMAO como acceptor final de elétrons, com par redox TMAO/TMA que apresenta potencial de redução de +130mV, mais alto entre os aceptores aqui testados, DMSO e fumarato.

6 CONCLUSÃO

Sendo *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) um patógeno humano de relevância para a saúde pública, o conhecimento do seu metabolismo é de grande importância para contribuir no estudo para a produção do polissacarídeo para uso vacinal, além de compreender o desenvolvimento da patogênese por essa bactéria. Frente à possibilidade de utilizar além do oxigênio outros aceptores finais de elétrons de diferentes estruturas químicas e especificidades, já demonstra a versatilidade e poder de adaptação desta bactéria a variadas condições ambientais na qual é imposta.

Através do cultivo de Hib realizado em ambiente aeróbio, anaeróbio e a interface entre as duas condições aqui apresentados, é possível concluir que fumarato e DMSO podem ser utilizados por Hib como aceptores finais de elétrons para o seu crescimento. Entretanto, a linhagem bacteriana GB3291 utilizada, capsulada, demonstrou preferência por ambientes aeróbicos onde apresentou maior crescimento celular quando comparado com as condições de anaerobiose. Na literatura, já citada ao longo do trabalho, existem relatos sobre presença de *operons* para a utilização de aceptores como DMSO, fumarato e nitrato, escolhidos para esse estudo, e, portanto, corroborando com esses relatos, a de existência *operons* em variadas cepas de Hi, capsuladas e não capsuladas.

A produção de polissacarídeo em ambiente de aerobiose atingiu a ordem de 140 mg/L de PRP, enquanto em anaerobiose, 60 mg/L (maiores concentrações atingidas em cada condição). Nos ensaios em anaerobiose, em biorreatores, foi ainda observado que o fumarato é consumido no decorrer do cultivo com formação e acúmulo de succinato majoritariamente, fato este que não foi observado nos ensaios em frascos agitados. A produção de acetato foi a segunda maior, referente ao metabolito ácido formado, diferentemente da condição aeróbica, no qual o principal ácido formado é o acetato. A formação de succinato e acetato, além de outros ácidos, podem ter influenciado e afetado o crescimento celular.

Como perspectivas para projeto, uma metodologia para quantificar DMSO deverá ser desenvolvida e permitir um estudo mais detalhado desse acceptor no metabolismo do microrganismo frente a diferentes tensões de oxigênio, como foi realizado para o fumarato. E um estudo de varredura com diferentes cepas de *Haemophilus influenzae*

considerando as não tipáveis, os diferentes sorotipos dentro das tipáveis e avaliar o comportamento cinético de crescimento com os diferentes aceptores estudados neste trabalho.

REFERÊNCIAS*

AGRAWAL, A.; MURPHY, T. F. *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3728–3732, 2011.

ALBANI, S. M. F.; SILVA, M. R. DA; FRATELLI, F.; et al. Polysaccharide purification from *Haemophilus influenzae* type b through tangential microfiltration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 67–73, 2014.

ALPHEN, L. VAN; BROEK, L. G. DEN; BLAAS, L.; HAM, M. VAN. Blocking of fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* by sialyl gangliosides. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4473–4477, 1991.

ANDERSON, P. Antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 1, p. 233–238, 1983.

ANDERSON, P.; PETER, G.; JOHNSTON, R. B.; WETTERLOW, L. H.; SMITH, D. H. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Haemophilus influenzae*, type b. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. 1, p. 39–44, 1972.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Metabolismo bacteriano - a: metabolismo heterotrófico. **Microbiologia Básica**. p.18–20, 1999.

BARRETT, E. L.; KWAN, H. S. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 131–149, 1985.

BILOUS, P. T.; WEINER, J. H. Dimethyl sulfoxide reductase activity by anaerobically grown *Escherichia coli* HB101. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 3, p. 1151–1155, 1985.

BRAGA, L.; SILVA, T. DA; CINTRA, F.; TAKAGI, M. Mathematical model for simultaneous microfiltration and ultrafiltration of *Haemophilus influenzae* type b to cell separation and polysaccharide recovery. **Journal of Membrane Science**, v. 481, p. 188–194, 2015.

CALHOUN, L. N.; KWON, Y. M. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 375–386, 2011.

CECCHINI, G.; MAKLASHINA, E.; YANKOVSKAYA, V.; IVERSON, T. M.; IWATA, S. Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. **FEBS Letters**, v. 545, n. 1, p. 31–38, 2000

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

CHRISTOPH, M. T.; HOOD, D. W.; MOXON, R. E. Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. **Principles of Bacterial Pathogenesis**, p. 699–705, 2001.

CINTRA, F. O. **Modelagem matemática e otimização da produção de exopolissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b**, 2014.

COTTER, S. E.; SURANA, N. K.; ST GEME, J. W. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 199–205, 2005.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALES, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 821–829, 2007.

DOMINGUEZ, S. R.; DAUM, R. S. Toward global *Haemophilus influenzae* type b immunization. **CID**, v. 37, p. 1600–1602, 2003.

EDWARDS, J. S.; PALSSON, B. O. Systems properties of the *Haemophilus influenzae* Rd metabolic genotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17410–17416, 1999.

ELLISON, R. T.; GIEHL, T. J.; LAFORCE, F. M. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 11, p. 2774–2781, 1988.

ERWIN, A. L.; NELSON, K. L.; MHLANGA-MUTANGADURA, T.; et al. Characterization of genetic and phenotypic diversity of invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5853–5863, 2005.

FAIRHURST, R. M.; WANG, C. X.; SIELING, P. A.; MODLIN, R. L.; BRAUN, J. CD1-restricted T cells and resistance to polysaccharide-encapsulated bacteria. **Immunology Today**, v. 19, n. 6, p. 257–9, 1998.

FINK, D. L.; GREEN, B. A.; ST GEME, J. W. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 4902–7, 2002.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 1995.

FOXWELL, A. R.; KYD, J. M.; CRIPPS, A. W. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 62, n. 2, p. 294–308, 1998.

GADELHA, C.; AZEVEDO, N. Inovação em experiência recente e constrangimentos estruturais. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, n. suplemento 2, p. 697–724, 2003.

GERLACH, G.; REIDL, J. NAD⁺ utilization in *Pasteurellaceae*: simplification of a complex pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 19, p. 6719–27, 2006.

GRANOFF, D. M.; BOIES, E. G.; MUNSON JR., R. S. Immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide- diphtheria toxoid conjugate vaccine in adults. **Journal of Pediatrics**, v. 105, p. 22–27, 1984.

GUNSALUS, R. P.; PARK, S. J. Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: Control by the ArcAB and fnr regulons. **Research in Microbiology**, v. 145, n. 5-6, p. 437–450, 1994.

HAMBORSKY, J.; KROEGER, A.; WOLFE, C. *Haemophilus influenzae* type b. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. v. 13, p.119–134, 2015.

HARRINGTON, J. C.; WONG, S. M. S.; ROSADINI, C. V; et al. Resistance of *Haemophilus influenzae* to reactive nitrogen donors and gamma interferon-stimulated macrophages requires the formate-dependent nitrite reductase regulator-activated *ytfE* gene. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 1945–58, 2009.

HARRISON, L. H.; BROOME, C. V; HIGHTOWER, A. W. *Haemophilus influenzae* vaccine : an efficacy type study b polysaccharide. **Pediatrics**, v. 84, n. 2, p. 255–261, 1989.

HENDERSON, I. A. N. R.; NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1231–1243, 2001.

HENDRIXSON, D. R.; ST GEME, J. W. The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. **Molecular Cell**, v. 2, n. 6, p. 841–850, 1998.

HERRIOTT, R.; MEYER, E.; VOGT, M. Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 517–524, 1970.

HOLLÄNDER, R.; MANNHEIM, W. Characterization of hemophilic and related bacteria by their respiratory quinones and cytochromes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 25, n. 2, p. 102–107, 1975.

IVERSON, T. M.; LUNA-CHAVEZ, C.; CECCHINI, G.; REES, D. C. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. **Science**, v. 284, n. June, p. 1961–1966, 1999.

JACOBS, R. F.; WILSON, C. B.; LAXTON, J. G.; HAAS, J. E.; SMITH, A. L. Cellular uptake and intracellular activity of antibiotics against *Haemophilus influenzae* type b. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 145, n. 2, p. 152–159, 1982.

JIANG, D.; TIKHOMIROVA, A.; KIDD, S. P. *Haemophilus influenzae* strains possess variations in the global transcriptional profile in response to oxygen levels and this influences sensitivity to environmental stresses. **Research in Microbiology**, p. 1–7, 2015.

KAMEN, M. D.; HORIO, T. Bacterial cytochromes: I. Structural aspects. **Annual Review of Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 673–700, 1970.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). **Citrate cycle (TCA cycle) - *Haemophilus influenzae* 10810 (serotype b)**. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hiu00020>. Acessado em 22/12/2015.

KILIAN, M. A Taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. **Journal of General Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 9–62, 1976.

KILIAN, M.; MESTECKY, J.; SCHROHENLOHER, R. E. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. **Infection and Immunity**, v. 26, n. 1, p. 143–149, 1979.

KIM, B. H.; GADD, G. M. **Bacterial Physiology and Metabolism**. 2008.

KOLKER, E., et al. Initial proteome analysis of model microorganism *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 15, p. 4593–4602, 2003.

KOTRBA, P.; INUI, M.; YUKAWA, H. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 6, p. 502–517, 2001.

KRÖGER, A. Electron-transport phosphorylation coupled to fumarate reduction in anaerobically grown *Proteus rettgeri*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 347, p. 273–289, 1974.

KRÖGER, A. Fumarate as a terminal acceptor of phosphorylative electron transport. **Biochimica et Biophysica Acta Rev Bioenergetics**, v. 505, p. 129–145, 1978.

KUBIET R., M. . R. Adhesion of nontypeable *Haemophilus influenzae* from blood and sputum to human tracheobronchial mucins and lactoferrin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 899–902, 1995.

KUBIET, M.; RAMPHAL, R.; WEBER, A.; SMITH, A. Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3362–3367, 2000.

KURATANA, M.; ANDERSON, P. Host metabolites that phenotypically increase the resistance of *Haemophilus influenzae* type b to clearance mechanisms. **Journal of Infection Disease**, v. 163, n. 5, p. 1073–1079, 1991.

LICHTENEGGER, S.; BINA, I.; ROIER, S.; et al. Characterization of lactate utilization and its implication on the physiology of *Haemophilus influenzae*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3-4, p. 490–8, 2014.

LÖNNERDAL, B.; IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, p. 93–110, 1995.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 388–404, 2007.

MCCRINDLE, S. L.; KAPPLER, U.; MCEWAN, A. G. Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. **Advances in Microbial Physiology**. v. 50, p.149–183, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <
<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/10/casos-de-meningite-em-criancas-brasileiras-diminuiram-nos-ultimos-dois-anos>> Acessado em 09/12/2015.

MOND, J. J.; LEES, A.; SNAPPER, C. M. T cell-independent antigens type 2. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 665–692, 1995.

MUSSER, J. M.; BARENKAMP, S. J.; GRANOFF, D. M.; SELANDER, R. K. Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 1, p. 183–191, 1986.

OTHMAN, D. S. M. P.; SCHIRRA, H.; MCEWAN, A. G.; KAPPLER, U. Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. March, p. 69, 2014.

PITTMAN, M. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 53, n. 4, p. 471–492, 1931.

PLAUT, A. G. The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p.603-622, 1983.

POSTMA, P. W.; LENGELER, J. W.; JACOBSON, G. R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 543–594, 1993.

QUINN, P. H.; CROSSON, F. J.; WINKELSTEIN, J. A.; MOXON, E. R. Activation of the

alternative complement pathway by *Haemophilus influenzae* type b. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 1, p. 400–2, 1977.

RAGHUNATHAN, A.; PRICE, N. D.; GALPERIN, M. Y.; et al. In silico metabolic model and protein expression of *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20 in rich medium. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 8, n. 1, p. 25–41, 2004

READ, R. C.; WILSON, R.; RUTMAN, A.; et al. Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 3, p. 549–58, 1991.

RIBEIRO, M.; SILVA. **Estratégias de cultivo para a produção de polissacarídeo capsular por *Haemophilus influenzae* tipo b e determinação de parâmetros de qualidade para o produto**, 2010.

RICHARDSON, D. J. Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment. **Microbiology**, v. 146, p. 551–571, 2000.

RUBIN, L. G.; MOXON, E. R. Pathogenesis of blood-stream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 280–284, 1983.

SATOLA, S. W.; SCHIRMER, P. L.; FARLEY, M. M. Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and non encapsulated b capsule-negative variants. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3639–3644, 2003.

SCHILLING, C. H.; PALSSON, B. O. Assessment of the metabolic capabilities of *Haemophilus influenzae* Rd through a genome-scale pathway analysis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 203, p. 249–283, 2000.

SCHRYVERS, A.; WEINER, J. H. The anaerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Purification and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 19, p. 9959–9965, 1981.

SINCLAIR, P. R.; WHITE, D. C. Effect of nitrate, fumarate, and oxygen on the formation of the membrane-bound electron transport system of *Haemophilus parainfluenzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 2, p. 365–372, 1970.

SPAHICH, N. A.; GEME, J. W. ST. Structure and function of the *Haemophilus influenzae* autotransporters. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. September, p. 1–9, 2011.

SPIRO, S.; GUEST, J. R. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 399–428, 1990.

ST GEME, J. W.; FALKOW, S.; BARENKAMP, S. J. High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 7, p. 2875–2879, 1993.

SUKUPOLVI-PETTY, S.; GRASS, S.; ST GEME, J. W. The *Haemophilus influenzae* Type b *hcsA* and *hcsB* gene products facilitate transport of capsular polysaccharide across the outer membrane and are essential for virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3870–3877, 2006.

TAKAGI, M.; ZANGIROLAMI, T. C.; TANIZAKI, M. M.; CABRERA-CRESPO, J. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. **Communication Current Research and Educational Topics in Applied Microbiology vol.2**. p.602–608, 2007.

TAKAGI, M., CABRERA-CRESPO, J., ZANGIROLAMI, T. C., RAW, I., TANIZAKI, M. M. Improved cultivation conditions for polysaccharide production by *H. influenzae* type b. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 182–188, 2006.

TATUSOV, R. L.; MUSHEGIAN, A. R.; BORK, P.; et al. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. **Current Biology : CB**, v. 6, n. 3, p. 279–91, 1996.

THÖNY-MEYER, L. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 61, n. 3, p. 337–376, 1997.

TILLER, F.-W. Biochemical differentiation of *Haemophilus influenzae*. Additional characterization of biotypes by carbohydrate fermentation patterns. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene / A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, v. 253, n. 2, p. 236–246, 1982.

TUNKEL, A. R.; SCHELD, W. M. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 118–136, 1993.

TUOMANEN, E. Piracy of adhesins: Attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. **Infection and Immunity**, v. 54, n. 3, p. 905–908, 1986.

TUYAU, J. E.; SIMS, W.; WILLIAMS, R. A. D. The acid end-products of glucose metabolism of oral and other *Haemophilus*. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1787–1793, 1984.

WARD, J. I.; BROOME, C. V.; HARRISON, L. H.; SHINEFIELD, H.; BLACK, S. *Haemophilus b* vaccines: future *influenzae* Type Lessons for the. **Pediatrics**, v. 81, n. 6, p. 886–893, 1988.

WATT, J. P.; WOLFSON, L. J.; O'BRIEN, K. L.; et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. **The**

Lancet, v. 374, n. 9693, p. 903–911, 2009.

WHITE, D. C.; GRANICK, S. Hemin Biosynthesis in *Haemophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 85, n. November, p. 842–850, 1963.

WILWERT, M. W.; PARIZOTO, J. C.; SILVA, M. R.; et al. The use of soybean peptone in bacterial cultivations for vaccine production. **Soybeans: Cultivations, Uses and Nutrition**. p.387–400, 2011.

WISSENBACH, U.; TERNES, D.; UNDEN, G. An *Escherichia coli* mutant containing only demethylmenaquinone, but no menaquinone: Effects on fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate respiration. **Archives of Microbiology**, v. 158, p. 68–73, 1992.

WONG, S. M. S.; AKERLEY, B. J. Genome-scale approaches to identify genes essential for *Haemophilus influenzae* pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. March, p. 23, 2012.

WONG, S. M. S.; ALUGUPALLI, K. R.; RAM, S.; AKERLEY, B. J. The ArcA regulon and oxidative stress resistance in *Haemophilus influenzae*. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1375–1390, 2007.

ZINDER, S. H.; BROCK, T. D. Dimethyl sulfoxide as an electron acceptor for anaerobic growth. **Archives of Microbiology**, v. 116, p. 35–40, 1978.