

JULIANA ÂNGELO DE SOUZA

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUTOS DO METABOLISMO AERÓBIO E  
ANAERÓBIO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
SOROTIPO 8**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

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

T

S729a  
2016 Souza, Juliana Ângelo de, 1983-  
Análise do crescimento e produtos do metabolismo aeróbio e anaeróbio de isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8 / Juliana Ângelo de Souza. – Viçosa, MG, 2016.  
xii, 44f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Denise Mara Soares Bazzolli.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 34-44.

1. Suínos - Doenças. 2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*.  
3. Pleuropneumonia suína. 4. Virulência (Microbiologia).  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

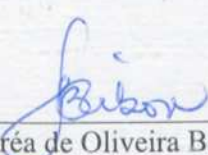
CDD 22. ed. 636.4

JULIANA ÂNGELO DE SOUZA

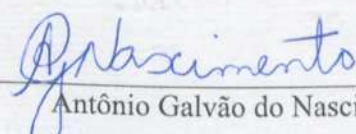
ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUTOS DO METABOLISMO AERÓBIO E  
ANAERÓBIO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
SOROTIPO 8

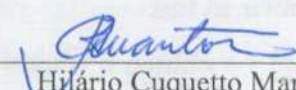
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.


APROVADA: 30 de maio de 2016

  
\_\_\_\_\_  
Andréa de Oliveira Barros Ribon

  
\_\_\_\_\_  
Mateus Ferreira Santana

  
\_\_\_\_\_  
Antônio Galvão do Nascimento

  
\_\_\_\_\_  
Hilário Cuquetto Mantovani  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Denise Mara Soares Bazzolli  
(Orientadora)

*“Somebody said that it couldn’t be done. But  
he with a chuckle replied  
That “maybe it couldn’t,” but he would be one  
Who wouldn’t say so till he’d tried”.*

Edgar Albert Guest

## AGRADECIMENTOS

Trabalhos bem executados são o resultado de um conjunto de fatores que contribuem para o seu sucesso. Primeiramente, a Deus, sem Ele nada seria possível.

A minha família, meus pais Sebastião e Maria Lúcia pelo incentivo ao estudo e à busca por conhecimento durante toda a minha vida, e à minha irmã que junto comigo compartilhou a experiência maravilhosa de estudar e viver na cidade de Viçosa.

A Universidade Federal de Viçosa, e em especial ao Departamento de Microbiologia Agrícola pela grande oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos. À FAPEMIG e à CAPES/ PROEX pelo financiamento do projeto.

A minha orientadora, prof. Denise Bazzolli, pela dedicação, pelo apoio (ainda no período de aulas), pela amizade e orientação durante todo o mestrado.

Ao prof. Wendel Silveira, meu coorientador, que me permitiu continuar fazendo parte da família do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos; e aos amigos do LabFis: prof. Galvão, Lorena, Raquel, e em especial Mari, Fernando, Nívea e Hugo. Aos que foram embora: Juan, Maria Fernanda e Daniel. Vocês foram grandes responsáveis pela conclusão deste trabalho. Muito obrigada!!

Ao prof. Hilário Mantovani, meu coorientador, pela dedicação e ensinamentos na reta final do mestrado. Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios, principalmente Elsa, Cláudia, Sofia, Ju Soares e Marcílio pelo apoio durante as curvas de crescimento e análises por HPLC.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos: Thyara, Isabelle, Newton, Ana Carolina, Josi, Larissa, Vanessa, Kaliane, Lucas e Jonathan pela amizade, pelos conselhos, pelos grupos de estudo na Biblioteca. Muito obrigada!

Ao Caio Roberto, grande incentivador para que eu escolhesse o mestrado na UFV.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e do BIOAGRO, Letícia, Sandra, José Carlos, “Seu” Paulo, Emília, Evandro, pela ajuda durante o mestrado.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia pelos ensinamentos durante o mestrado.  
Muito obrigada a todos!!

## **BIOGRAFIA**

JULIANA ÂNGELO DE SOUZA, filha de Sebastião de Souza Júnior e Maria Lúcia Ângelo Souza, nasceu no dia 25 de outubro de 1983 na cidade de João Monlevade, Minas Gerais. Graduou-se em Biomedicina pela Universidade Presidente Antônio Carlos, Ipatinga, em janeiro de 2010. Em fevereiro de 2014 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Microrganismos, condições de cultivo e manutenção.....	13
3.2. Curvas de crescimento de <i>A. pleuropneumoniae</i> em condições de aerobiose e anaerobiose.....	14
3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento de <i>A. pleuropneumoniae</i> sorotipo 8.....	14
3.4. Avaliação da produção de ácidos orgânicos por <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Crescimento em condições de aerobiose e anaerobiose.....	16
4.2. Determinação de parâmetros cinéticos do crescimento de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	25
4.3. Avaliação da produção de ácidos orgânicos por <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	27
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	33

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
------------------------------------	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal  
ATP – Adenosina trifosfato  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
BHI – *Brain heart infusion*  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DO – Densidade ótica  
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
HPLC – *High performance liquid chromatography*  
IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
kDa – kilo Dalton  
LB – Luria Bertani  
Ln – Logaritmo natural  
LPS – Lipopolissacarídeo  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NCBI – National Center for Biotechnology Information  
RTX toxins – repeat in toxin  
sRNAs – Ácidos ribonucleicos pequenos  
TSA – Tryptic Soy Agar

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Microrganismos utilizados neste estudo .....	11
<b>Tabela 2.</b> Velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) em caldo BHI, caldo BHI acrescido de glicose e galactose, e pH final em condições de aerobiose e anaerobiose .....	27
<b>Tabela 3.</b> Produção de ácidos orgânicos por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> cultivado em caldo BHI/NAD .....	28
<b>Tabela 4.</b> Produção de ácidos orgânicos por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> cultivado em BHI/NAD suplementado com glicose .....	29
<b>Tabela 5.</b> Produção de ácidos orgânicos por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> cultivado em BHI/NAD suplementado com galactose .....	30

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Matriz polissacarídica encontrada na cápsula de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 linhagem referência 405 (ALTMAN et al., 1990).**..... 4
- Figura 2. Vias Metabólicas Centrais de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 3 JL03.** É possível verificar a presença dos genes da via glicolítica, bem como os genes da via das pentoses fosfato. Ciclo do ácido tricarbóxico incompleto e via do glioxilato ausente. Fonte: XU et al., 2008.....8
- Figura 3. Mudanças na expressão gênica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 1 linhagem referência em condições de anaerobiose.** (A). Genes diferentemente expressos em anaerobiose, entre eles genes de enzimas da via glicolítica, genes do ciclo do ácido tricarbóxico e da via das pentoses fosfato. (B) e (C). Concentrações de glicose e piruvato no sobrenadante da cultura em aerobiose e anaerobiose. Os asteriscos mostram que houve diferença significativa. Fonte: Li et al (2013) .....9
- Figura 4. Caracterização do crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* cultivados em caldo BHI.**..... 18
- Figura 5. Caracterização do crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* cultivados em caldo BHI acrescido de glicose** .....21
- Figura 6. Caracterização do crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* cultivados em caldo BHI acrescido de galactose** ..... 24

## RESUMO

SOUZA, Juliana Ângelo de. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Análise do crescimento e produtos do metabolismo aeróbio e anaeróbio de isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 8.** Orientadora: Denise Mara Soares Bazzolli. Coorientadores: Wendel Batista da Silveira e Hilário Cuquetto Mantovani.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* é o agente etiológico da pleuropneumonia suína, uma doença respiratória que afeta suínos de todas as idades no mundo. Atualmente são descritos 16 sorotipos da bactéria com virulência distinta. Esta virulência de *A. pleuropneumoniae* é multifatorial, e inclui as toxinas RTX, cápsula, produção de biofilme, LPS e proteases. O metabolismo central possui papel importante na virulência bacteriana, uma vez que a adaptação da bactéria à disponibilidade de nutrientes é essencial para a sobrevivência e colonização no hospedeiro. Os isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8, 1022 e 780, considerados os de maior e menor virulência em estudo realizado em *Galleria mellonella* foram utilizados neste trabalho, assim como a linhagem referência do sorotipo 8. Na tentativa de explicar a razão da diferença de virulência apresentada pelos isolados foram feitas curvas de crescimento em caldo BHI, caldo BHI acrescido de glicose e caldo BHI acrescido de galactose, em condições de aerobiose e anaerobiose. A determinação da velocidade específica de crescimento e a análise da produção de ácidos orgânicos, de cada um dos isolados, também foi realizada, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Os resultados mostraram que o isolado 1022 apresentou maior velocidade específica de crescimento em relação ao isolado 780 e à linhagem referência em todas as condições investigadas. O perfil de ácidos orgânicos produzidos foram distintos em aerobiose e em anaerobiose, sendo o ácido acético o de maior produção em aerobiose e o ácido láctico maior produção em anaerobiose. Portanto, foi possível verificar que o isolado 1022 apresentou maior produção de ácido láctico em anaerobiose em relação ao isolado 780 e à linhagem referência. A velocidade de crescimento e a produção de ácido láctico mostraram-se diferenciadas no isolado 1022 indicando que a maior virulência, apresentada por esse isolado no ensaio de infecção, pode estar diretamente relacionada ao seu metabolismo.

## ABSTRACT

SOUZA, Juliana Ângelo de. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa. May, 2016. **Analysis of growth and products of aerobic and anaerobic metabolism of clinical isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8.** Adviser: Denise Mara Soares Bazzolli. Co-advisers: Wendel Batista da Silveira and Hilário Cuquetto Mantovani.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a respiratory disease that affects pigs of all ages in the world. Currently, there are 16 described serotypes of the bacteria with difference in virulence. The virulence of *A. pleuropneumoniae* is multifactorial and includes the RTX toxins, capsule, biofilm production, LPS and proteases. The central metabolism plays an important role in bacterial virulence, since the adaptation of bacteria to the availability of nutrients is essential for survival and colonization in the host. Clinical isolates of *A. pleuropneumoniae* serotype 8, 1022 and 780, considered the highest and lowest virulence in the study in *Galleria mellonella* were used in this work, as well as the serotype reference line 8. In an attempt to explain the reason of virulence difference presented by the isolates, growth curves were made in BHI broth, BHI broth plus glucose and BHI plus galactose, in aerobiosis and anaerobiosis. The determination of the specific growth rate and the analysis of the production of organic acids from each isolate was also carried out, both in aerobiosis and in anaerobiosis. The results showed that isolated 1022 showed higher specific growth rate compared to the isolated 780 and the reference strain, in all investigated conditions. The profile of organic acids produced were different in aerobiosis when compared to anaerobiosis. Acetic acid had increased production under aerobic conditions, and lactic acid production under anaerobic conditions was higher. Therefore, it was possible to verify that the isolated in 1022 showed higher production of lactic acid anaerobically relative to the isolated 780 and the reference strain. The growth rate and lactic acid production were shown to be differentiated in the isolate 1022, indicating that the major virulence showed by this isolate in the infection test, can be directly related to his metabolism.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca crescente por melhorias na alimentação humana está associada ao crescente e constante aperfeiçoamento de diversos setores, incluindo a suinocultura. Dados do último estudo realizado pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) no ano de 2014 apontam o Brasil como ocupante do quarto lugar na produção e exportação de carne suína, ficando atrás apenas de países como Estados Unidos, China e União Europeia. Os investimentos e estudos realizados em prol da suinocultura contribuíram bastante para aumento da qualidade da carne produzida, por meio do melhoramento genético que permitiu a redução do percentual de colesterol, gordura total e calorias na carne.

A prática da suinocultura exige aplicação de uma série de medidas para se evitar a disseminação de doenças infecciosas, principalmente de caráter respiratório, que geralmente levam a perdas econômicas significativas. O aumento do número de animais confinados está associado à disseminação de doenças respiratórias que não são controladas eficientemente com vacinas, muitas vezes pela indisponibilidade de uma vacina eficiente. Esta situação é recorrente em relação à pleuropneumonia suína, uma doença infecciosa que acomete suínos de todas as idades e é disseminada em todos os países produtores de suínos.

O agente etiológico da pleuropneumonia suína é a bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Atualmente, *A. pleuropneumoniae* possui 16 sorotipos conhecidos e cada um destes apresenta um perfil distinto de virulência. A virulência de *A. pleuropneumoniae* é multifatorial, e inclui a produção de toxinas Apx com atividade hemolítica e/ou citotóxica, sendo que cada sorotipo produz uma combinação específica destas toxinas; a formação de biofilme, cápsula, sideróforos e a camada LPS. E, alguns estudos mostraram que o metabolismo central de bactérias patogênicas pode ser decisivo no estabelecimento da doença.

Bactérias patogênicas devem ser capazes de adaptar o seu metabolismo à disponibilidade de nutrientes de maneira a garantir a sua sobrevivência no hospedeiro, e assim colonizar e causar a doença. Na família *Pasteurellaceae*, a qual pertence *A. pleuropneumoniae*, destacam-se estudos realizados com *Haemophilus influenzae*. Nestes estudos os pesquisadores foram capazes de demonstrar uma mudança na via de utilização do piruvato quando a concentração de oxigênio no meio foi modificada, tendo uma maior produção de ácido acético em aerobiose e uma maior

produção de ácido fórmico em anaerobiose. A análise dos produtos do metabolismo se faz importante não somente para a identificação das vias metabólicas utilizadas em cada condição de crescimento da bactéria patogênica, mas também é importante para analisar de que forma acontece a adaptação do microrganismo ao nicho em que ele se encontra dentro do hospedeiro.

Tendo em vista a diferença na virulência apresentada por alguns isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 provenientes do Brasil, em ensaios de virulência *in vivo* realizados em *Galleria mellonella*, os objetivos deste trabalho foram analisar o perfil de crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8, bem como analisar o perfil de metabólitos produzidos em condições de aerobiose e anaerobiose na tentativa de relacionar estas características com a diferença da virulência entre os isolados clínicos investigados, uma vez que outros parâmetros anteriormente investigados, como produção de toxinas e formação de biofilme, não revelaram diferenças significativas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

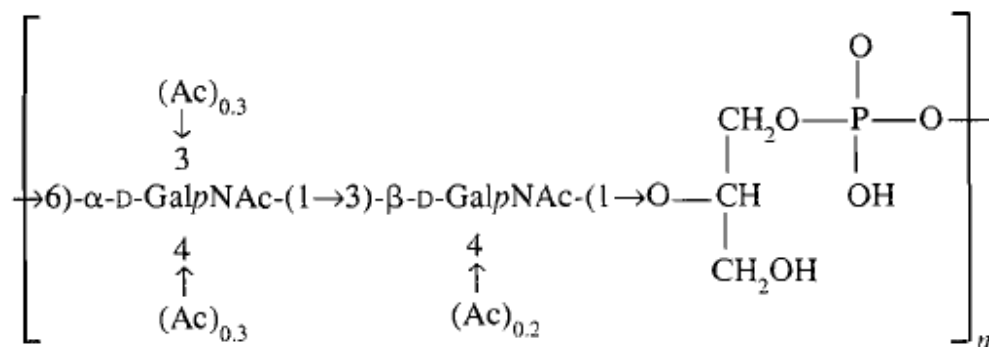
A suinocultura não é distribuída de forma homogênea em todos os países do mundo. Países do Oriente Médio, por razões religiosas, não representam grandes consumidores ou produtores de suínos. Por outro lado, países como a China, Estados Unidos, União Europeia e o Brasil aparecem como grandes produtores e exportadores. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA, o Brasil produziu mais de três milhões de toneladas de carne suína em 2014. Ainda de acordo com a mesma associação, no Brasil, os Estados com as maiores produções de carne suína são Santa Catarina e Rio Grande do Sul, seguidos por Paraná e Minas Gerais (ABPA, 2014). O confinamento de muitos animais em um espaço muitas vezes restrito facilita a disseminação de doenças, principalmente de enfermidades de origem respiratória e que podem ser transmitidas pela proximidade de um animal com o outro (JONG et al., 2014). Uma das principais doenças respiratórias que acometem os suínos está a pleuropneumonia suína causada pela bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (KLITGAARD et al., 2012; QIN et al., 2016).

A pleuropneumonia suína é uma doença altamente contagiosa, que causa necrose nos tecidos respiratórios, e pode acometer animais em todas as idades (BECKER et al., 2011). Em estudo realizado por Vaz e Silva (2004) com os animais doentes mostraram que existe, de fato, um aumento nas despesas decorrentes da criação destes animais quando há a infecção. Quando esta acomete animais mais novos, existe um risco de diminuição do desenvolvimento do animal devido à presença de pleurite e hepatização pulmonar, sendo esta última uma solidificação do tecido pulmonar que fica com aspecto macroscópico de um fígado vermelho em decorrência de exsudação aguda de hemácias e leucócitos.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa que pertence à família *Pasteurellaceae*, é anaeróbia facultativa e pode causar diferentes graus de hemólise das células do hospedeiro dependendo do sorotipo envolvido na infecção (BOSSÉ et al., 2002; JARMA et al., 2004). *A. pleuropneumoniae* é uma bactéria capsulada e que possui alta especificidade de hospedeiro, que é o suíno. Esta especificidade pode estar associada ao fato de que a bactéria só consegue obter ferro, necessário para o estabelecimento da doença, a partir da transferrina de suínos, e não de outros mamíferos (INZANA, 1991). Desta bactéria, são conhecidos 16 sorotipos

(SÁRKOZI et al, 2015), os quais são divididos em dois biotipos: o biotipo I inclui os sorotipos 1 a 12, 15 e 16, e não possuem a capacidade de sintetizar o NAD; enquanto que o biotipo II inclui os sorotipos 13 e 14 com capacidade de síntese do NAD a partir de precursores presentes no meio. Os sorotipos 1 e 5 foram subdivididos em 1a e 1b, e 5a e 5b, de acordo com análises nos polissacarídeos da cápsula (BOSSÉ et al., 2002; CHIERS et al., 2010; XU et al., 2010; SÁRKOZI et al., 2016).

A cápsula, além de diferenciar os sorotipos, é um importante fator de virulência para *A. pleuropneumoniae*, uma vez que confere proteção contra defesas do sistema imune do hospedeiro que envolvem a fagocitose e a ação de proteínas do sistema complemento (BANDARA et al., 2003). A Figura 1 mostra a estrutura dos polissacarídeos da cápsula de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8. A cápsula, juntamente com as fímbrias que se encontram na superfície celular, são responsáveis pela adesão da bactéria ao epitélio do sistema respiratório, considerado o primeiro passo para a colonização do hospedeiro (DOM et al., 1994).



**Figura 1. Matriz polissacarídica encontrada na cápsula de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 linhagem referência 405 (ALTMAN et al., 1990).**

A estrutura da cápsula de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 é constituída por duas unidades de 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose, glicerol e um grupo fosfato, sendo que o polissacarídeo capsular é do tipo ácido teicóico (ALTMAN et al., 1990). Estudos realizados por Perry e colaboradores (1990) permitiram um maior conhecimento a respeito da composição da cápsula dos sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, uma vez que é esse polissacarídeo que permite a distinção entre os sorotipos. Os pesquisadores classificaram o polissacarídeo capsular em três tipos: o

primeiro é aquele formado por sequências constituídas apenas de açúcares mantidos unidos por ligações glicosídicas entre si, como acontece nos sorotipos 5a, 5b e 10. O segundo é encontrado nos sorotipos 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 13 e 15, e é um polímero do tipo ácido teicóico em que uma ligação fosfato-diéster é responsável por ligar as unidades repetidas de glicosil-glicitol. O terceiro inclui o polissacarídeo capsular dos sorotipos 1, 4 e 12 que é formado por unidades repetidas de oligossacarídeos que são unidas grupos fosfato. A cápsula do sorotipo 14 possui uma estrutura que não é comum aos outros sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, essa estrutura possui um açúcar com natureza química semelhante ao *D*-glucano produzido por *Streptococcus pneumoniae* tipo 37 e ao açúcar galactomanana produzido por *Streptomyces* sp (MACLEAN et al., 2002; PERRY et al., 2004; PERRY & MACLEAN, 2004).

A virulência de *A. pleuropneumoniae* não se restringe apenas aos polissacarídeos capsulares, ela é multifatorial (CHIERS et al., 2010). As exotoxinas produzidas correspondem ao fator de virulência mais importante, estando envolvidas na indução e na manifestação das lesões no tecido pulmonar. As toxinas ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV podem ser encontradas de forma combinada em todos os sorotipos de *A. pleuropneumoniae*, entretanto cada sorotipo produz uma combinação específica entre elas, e um mesmo sorotipo não produz todas as toxinas (BOSSÉ et al., 2002). A secreção destas toxinas pode acontecer diretamente na superfície da célula do tecido pulmonar suíno, o que leva rapidamente ao rompimento desta (FREY, 2011; CHIERS et al., 2010). A toxina ApxI, é altamente hemolítica e citotóxica; ApxII é moderadamente citotóxica e fracamente hemolítica; já a ApxIII é altamente citotóxica, mas não é hemolítica. Os alvos principais destas toxinas são os eritrócitos, leucócitos, células epiteliais dos alvéolos pulmonares ou células pulmonares endoteliais do suíno (FREY, 2011).

Jarma e colaboradores (2004) realizaram experimentos com a linhagem referência do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* em condições de aerobiose e anaerobiose com o objetivo de verificar a produção das toxinas Apx. Eles verificaram que não houve diferença na produção de ApxI entre as duas tensões de oxigênio investigadas. Entretanto, a máxima expressão do gene *apxI* aconteceu quando o número de células bacterianas foi alto, e a disponibilidade de oxigênio estava baixa. A conclusão a que os pesquisadores chegaram foi de que as mudanças ambientais geradas com o crescimento bacteriano atuam como um sinal para a mudança na expressão gênica,

mas a disponibilidade de oxigênio não foi o principal responsável pela regulação da produção de ApxI.

A capacidade de sobreviver e se replicar de forma eficaz no hospedeiro faz com que o metabolismo seja um fator de virulência muito importante para os patógenos (EISENREICH et al., 2010), o que pode incluir *A. pleuropneumoniae*. Estes devem ser capazes de se adaptar à disponibilidade de nutrientes, bem como se adaptar às demais condições do ambiente em que se encontram. Entre estas condições destacam-se o pH, o oxigênio disponível e a pressão osmótica. *A. pleuropneumoniae* possui um metabolismo quimioheterotrófico com a capacidade de adaptação tanto para a fermentação quanto para a respiração celular dependendo da disponibilidade de oxigênio (XU et al., 2008). Estudos realizados por Sheehan e colaboradores (2003) destacaram a importância de certos genes de respiração anaeróbia para a sobrevivência de *A. pleuropneumoniae* no hospedeiro, assim como eles foram capazes de identificar genes para a fermentação de vários açúcares como a glicose e a frutose.

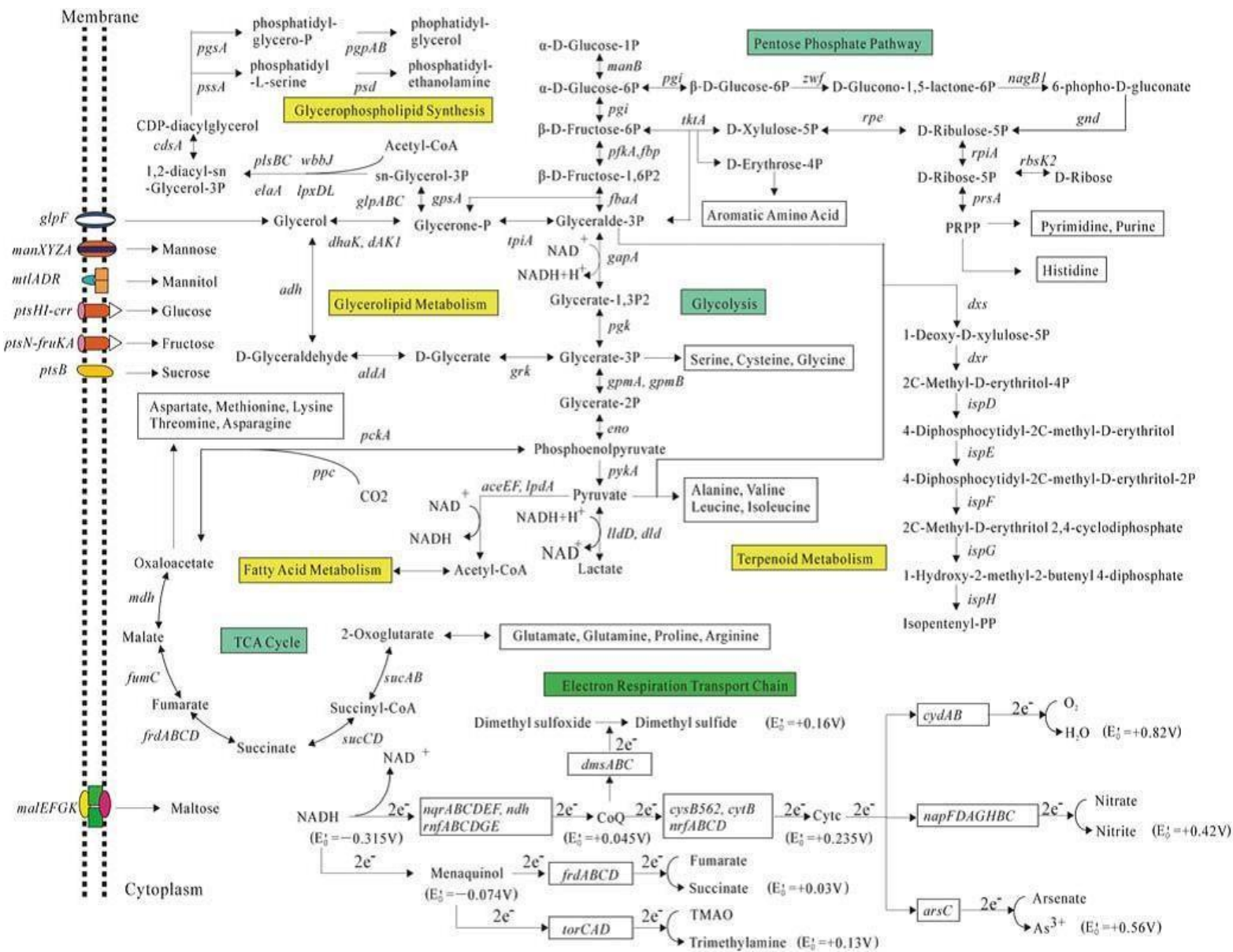
Para ser capaz de se adaptar às condições ambientais, além dos genes que codificam as enzimas das vias metabólicas, *A. pleuropneumoniae* deve “perceber” as mudanças que acontecem no ambiente e “responder” de forma apropriada. Neste sentido, é importante a presença do Sistema de Dois Componentes. Este é um conjunto formado por um sensor histidina quinase localizado na membrana e seu regulador de resposta relacionado (LIU et al., 2015). Análises do genoma de *A. pleuropneumoniae* apontaram a presença de cinco desses sistemas, e são eles ArcA/ArcB, CpxR/CpxA, NarP/NarQ, PhoB/PhoR e QseB/QseC (YgiX/YgiY) (XU et al., 2008).

Destes, o sistema formado por ArcA foi identificado como parte importante da virulência de *A. pleuropneumoniae*, regulando genes durante a mudança de uma condição de aerobiose para anaerobiose (BUETTNER et al., 2008). Já o sistema formado por QseB foi apontado como sendo responsável pela regulação direta de genes como *pilM*, que participa da aderência da bactéria a células do epitélio pulmonar do suíno. Mutantes  $\Delta pilM$  tiveram a capacidade de aderir às células reduzida (LIU et al., 2015).

ArcA é um importante regulador do metabolismo em outras bactérias, como a *Escherichia coli*, aumentando a expressão de genes envolvidos com a fermentação em condições de anaerobiose e reduzindo a expressão de genes envolvidos com a respiração aeróbia. Em um estudo realizado com *A. pleuropneumoniae*, mutantes *arcA* tiveram a capacidade de persistir no

hospedeiro diminuída, levando à conclusão de que a atenuação da virulência nos mutantes estava associada à incapacidade destes em adaptar o metabolismo em condições de anaerobiose, mostrando a importância de ArcA na virulência. Os mutantes não utilizaram o fumarato como aceptor final de elétrons, e desta forma não houve o fornecimento de succinato e outros precursores envolvidos na manutenção do ciclo do ácido tricarboxílico (BUETTNER et al., 2008).

Algumas bactérias da família *Pasteurellaceae*, como *Haemophilus influenzae*, possuem as vias metabólicas centrais com diferenças em relação a outras bactérias (OTHMAN et al., 2014), como as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, entre elas a *E. coli*. O estudo do genoma do isolado JL03, do sorotipo 3 de *A. pleuropneumoniae*, mostrou o mesmo padrão nas vias metabólicas centrais encontrado em *H. influenzae*. Conjuntos completos de genes para a glicólise, gliconeogênese e via das pentose fosfato estavam presentes no genoma. Entretanto, os genes para as enzimas citrato sintase, aconitase e isocitrato desidrogenase não foram encontrados. A consequência é um ciclo do ácido tricarboxílico incompleto, como acontece com as bactérias exclusivamente fermentativas. A Figura 2 mostra as vias metabólicas centrais do isolado JL03, podendo ser observada também uma cadeia respiratória ramificada, o que permite a utilização de diferentes aceptores de elétrons dependendo da disponibilidade de oxigênio no meio (XU et al., 2008).

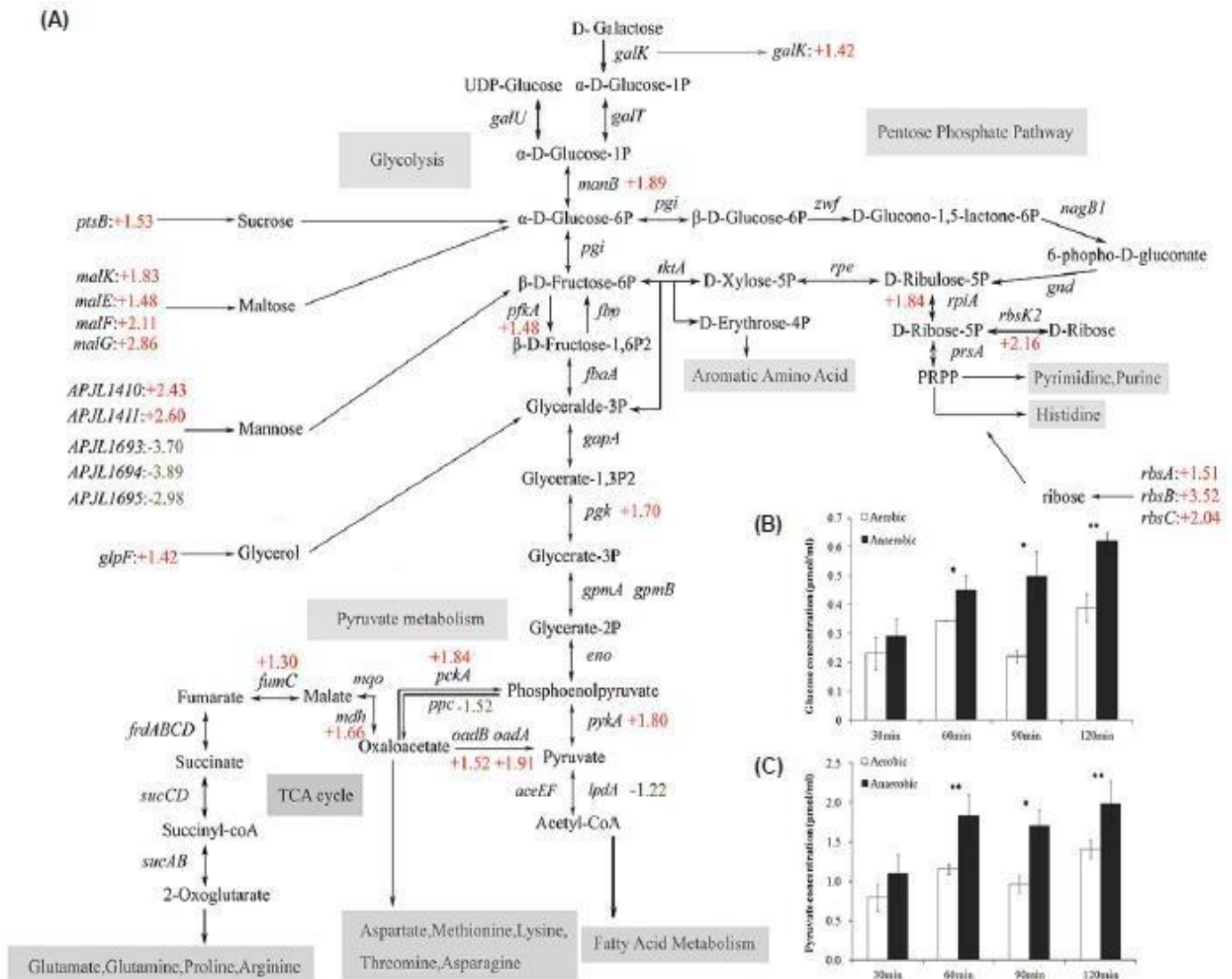


**Figura 2. Vias Metabólicas Centrais de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 3 JL03.** É possível verificar a presença dos genes da via glicolítica, bem como os genes da via das pentoses fosfato. Ciclo do ácido tricarbóxico incompleto e via do glioxilato ausente. Fonte: XU et al., 2008.

As mudanças que acontecem na expressão gênica de *A. pleuropneumoniae* durante a infecção, como consequência principalmente da diminuição da disponibilidade de oxigênio, foram consideradas responsáveis por induzir o metabolismo para a adaptação e sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Para verificar a diferença na expressão gênica em condições de aerobiose

e anaerobiose, Li e colaboradores (2013) realizaram um estudo do transcriptoma da linhagem referência do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* quando cultivada nessas duas condições. Os resultados mostraram que 631 genes foram diferencialmente expressos. Destes genes, 37% codificam proteínas envolvidas no metabolismo, indicando extensivas mudanças no perfil metabólico. A Figura 3 mostra a mudança na expressão gênica em anaerobiose.

Análises posteriores foram realizadas, e entre os resultados encontrados foi confirmado que o gene *acrA* foi diferencialmente expresso nas condições investigadas. Os genes das enzimas fosfofrutoquinase, fosfoglicerato quinase e enolase da glicólise estavam *up*- regulados, assim como os genes que codificam proteínas para o transporte de açúcares como maltose, manose e glicerol. Esses genes *up*-regulados indicam que em condições de anaerobiose, *A. pleuropneumoniae* intensifica a captação de fontes de carbono com a finalidade de produzir energia suficiente para sobrevivência. Os genes das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase, piruvato quinase e oxaloacetato descarboxilase estavam *up*-regulados, enquanto que outros genes como o da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase estavam *down*-regulados. Três genes de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico estavam *up*-regulados, são eles o da fumarato redutase, malato desidrogenase e fumarato hidratase (LI et al., 2013).



**Figura 3. Mudanças na expressão gênica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 1 linhagem referência em condições de anaerobiose.** (A). Genes diferentemente expressos em anaerobiose, entre eles genes de enzimas da via glicolítica, genes do ciclo do ácido tricarboxílico e da via das pentoses fosfato. (B) e (C). Concentrações de glicose e piruvato no sobrenadante da cultura em aerobiose e anaerobiose. Os asteriscos mostram que houve diferença significativa. Fonte: Li et al (2013).

O sequenciamento do genoma de diferentes sorotipos de *A. pleuropneumoniae* (BUETTNER et al., 2008; XU et al., 2008) comprovam a existência de um ciclo do ácido tricarboxílico incompleto na espécie. Entretanto, genes envolvidos na fermentação foram identificados.

A virulência de *A. pleuropneumoniae* pode ser influenciada por outros fatores encontrados no soro do hospedeiro no momento da infecção. Por exemplo, alguns estudos foram

realizados para confirmar que as catecolaminas podem estimular o crescimento bacteriano (BURTON et al., 2002; BELAY et al., 2003). Em *A. pleuropneumoniae*, a norepinefrina foi capaz de estimular o crescimento da bactéria ao se ligar à transferrina suína e facilitar a captação de ferro (LI et al., 2015).

Os aminoácidos ramificados isoleucina, valina e leucina também podem ser encontrados no soro, mesmo que em baixas concentrações. Esses aminoácidos foram alvo de um estudo conduzido por Subashchandrabose e colaboradores (2009). *A. pleuropneumoniae* expressa os genes que codificam a enzima acetohidroxiácido sintase, que catalisa a primeira reação da biossíntese dos aminoácidos ramificados. Os pesquisadores analisaram a expressão de promotores de genes que são positivamente regulados *in vivo* durante o crescimento da bactéria na ausência ou na presença dos aminoácidos ramificados no meio. Entre os promotores induzidos *in vivo* (*ivi*), os pesquisadores conseguiram identificar o operon *ilvIH* que contém os genes que codificam as duas subunidades da enzima acetohidroxiácido sintase. Do total, 25% dos promotores *ivi* foram induzidos durante o crescimento de *A. pleuropneumoniae* em meio de cultura na ausência dos aminoácidos ramificados, sugerindo que esta é a condição encontrada pela bactéria nos pulmões do hospedeiro. Outros promotores induzidos nesta condição foram encontrados, entre eles o promotor do gene *hfq*. Hfq é um regulador global, uma chaperonas de RNA que age se ligando a pequenos RNAs e RNA mensageiro, e afeta a expressão de alguns fatores de virulência em certos patógenos, entre eles *A. pleuropneumoniae* (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2013).

A diferença na virulência entre os sorotipos de *A. pleuropneumoniae* pode estar associada a inúmeros fatores e situações. Neste contexto, em um estudo realizado por Pereira e colaboradores (2015) observou-se uma diferença na virulência entre os isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8. Neste estudo foram utilizadas larvas do inseto *Galleria mellonella*, um hospedeiro alternativo, e os resultados que mostraram que o isolado clínico de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 1022 foi o que apresentou maior virulência e o isolado clínico 780 apresentou menor virulência. O isolado 1022, inclusive, mostrou-se capaz de sobreviver mais tempo na larva, o que não aconteceu com o isolado 780. Os resultados encontrados indicam que o isolado 1022 possui além dos fatores de virulência intrínsecos da espécie, diferentes formas de regulação da expressão gênica frente a estresses e possivelmente até outros fatores de virulência,

ainda não relatados. Diante dos fatos apresentados, a hipótese deste trabalho é de que a diferença de virulência entre isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 está associada a fatores relacionados ao crescimento desta bactéria.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos e no Laboratório de Genética de Microrganismos, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO – UFV - e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios localizado no Edifício Shotaro Shimoya – ECS – UFV.

#### 3.1. Microrganismos, condições de cultivo e manutenção

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho foram mantidas a -80 °C em caldo BHI (infusão de cérebro e coração) acrescido de uma solução de glicerol a 25%. Para os experimentos, estas linhagens também foram cultivadas em caldo BHI e BHI-ágar (Benton Dickinson, Germany), ambos os meios suplementados com NAD (Sigma Aldrich, USA) em uma concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup> e cultivadas à 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os isolados clínicos, assim como a linhagem referência correspondentes ao sorotipo 8 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* usados neste estudo estão descritos na Tabela 1. Os isolados clínicos foram obtidos a partir de pulmões de suínos doentes e cedidos pela Empresa Microvet Ltda, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A linhagem referência de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8, 405, foi cedida pelo professor Paul R. Langford – Imperial College London, Inglaterra, Reino Unido.

**Tabela 1.** Microrganismos utilizados neste estudo

<i>Actinobacillus</i> sorotipo 8	<i>pleuropneumoniae</i>	LD <sub>50</sub> em <i>Galleria mellonella</i> *	Origem
MV 780		8,41 x 10 <sup>7</sup>	Brasil/2009
MV 1022		1,04 x 10 <sup>4</sup>	Brasil/2011
Referência 405		5,52 x 10 <sup>5</sup>	Reino Unido

\* LD<sub>50</sub> = Dose letal 50, corresponde à dose infectante necessária do isolado de *A. pleuropneumoniae* para matar 50% de uma população de *Galleria mellonella*. Trabalho realizado por Pereira e colaboradores (2015).

### 3.2. Curvas de crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 em condições de aerobiose e anaerobiose

Os isolados clínicos foram inicialmente cultivados em meio BHI-ágar suplementado com NAD na concentração de  $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas para obtenção do pré-inóculo. As culturas tiveram  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  inicial ajustadas para 0,01 para ambas as condições de crescimento investigadas, aerobiose e anaerobiose.

O crescimento dos isolados de *A. pleuropneumoniae* foi investigado em experimentos elaborados em triplicata técnica e réplica biológica utilizando caldo BHI acrescido de NAD ( $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), em duas condições de cultivo foram adotadas, aerobiose e anaerobiose, e dois açúcares diferentes, glicose e galactose na concentração final de  $50 \text{ g}.\text{L}^{-1}$ . Para o crescimento em aerobiose foram utilizados frascos Erlenmeyers do tipo *side arm* de 250 mL contendo 40 mL de caldo BHI/NAD, aeração a 200 rpm em agitador rotatório New Brunswick Scientific à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para o crescimento em anaerobiose foram utilizados tubos de Hungate contendo 10 mL de caldo BHI/NAD que foram incubados em banho-maria (TBN-06/100 SBS) à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A condição de anaerobiose foi estabelecida com o caldo BHI preparado sob fluxo de nitrogênio em condições de anaerobiose. O pH inicial do meio foi determinado com leitura realizada em pHmetro (KASVI K-39-1014B), sendo ajustado para 7,2 como indicado pelo fabricante (Benton Dickinson, USA). Todos os frascos foram incubados e monitorados por um período de 12 horas.

### 3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8

A determinação do perfil de crescimento dos isolados clínicos investigados foi feita com a leitura da  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  a cada 30 minutos até 12 horas de crescimento, e a última leitura após 24 horas de crescimento. Da mesma forma que a densidade óptica, a determinação do pH final também foi realizada após 24 horas. Para analisar as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ), de cada um dos isolados, foi determinado o coeficiente angular da reta, obtida no gráfico que relaciona o logaritmo natural da densidade óptica da cultura com o tempo de incubação. Foram utilizados os softwares Sigma Plot (Software Inc., Califórnia, USA) e R 3.2.3 ([www.r-](http://www.r-)

project.org) para análise estatística dos dados. As análises estatísticas foram feitas utilizando os valores determinados para  $\mu$  e pH, dos três isolados nas condições investigadas.

#### 3.4. Avaliação da produção de ácidos orgânicos por *A. pleuropneumoniae*

Após 24 horas de crescimento foram coletados 4 mL de cultura de cada frasco, e estes foram distribuídos em dois microtubos de 2 mL e armazenados a -20 °C. Após o descongelamento, as amostras foram centrifugadas (Microcentrífugas 5418 e 5424, Eppendorf®, Germany) por 20 minutos a 10000 rpm. Posteriormente, 600  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para frascos específicos de cromatografia e armazenados a 4 °C até o momento da leitura.

A análise da produção de ácidos orgânicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em detector HPLC Dionex Ultimate 3000 Dual (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) acoplado a Índice de Refração (RI) Shodex RI-101 mantido a uma temperatura de 45 °C utilizando uma coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA, 300 x 7,8 mm mantida a 45 °C. A fase móvel foi preparada utilizando uma concentração de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de 5 mmol/L e fluxo de 0,7 mL/min. Os seguintes ácidos orgânicos foram utilizados para a calibração da curva padrão os ácidos: succínico, acético, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico e butírico. A concentração da solução estoque dos ácidos orgânicos foi de 10 mmol.L<sup>-1</sup>, exceto os ácidos isovalérico e acético que foram preparados em uma concentração final de 5mmol.L<sup>-1</sup> e 20 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

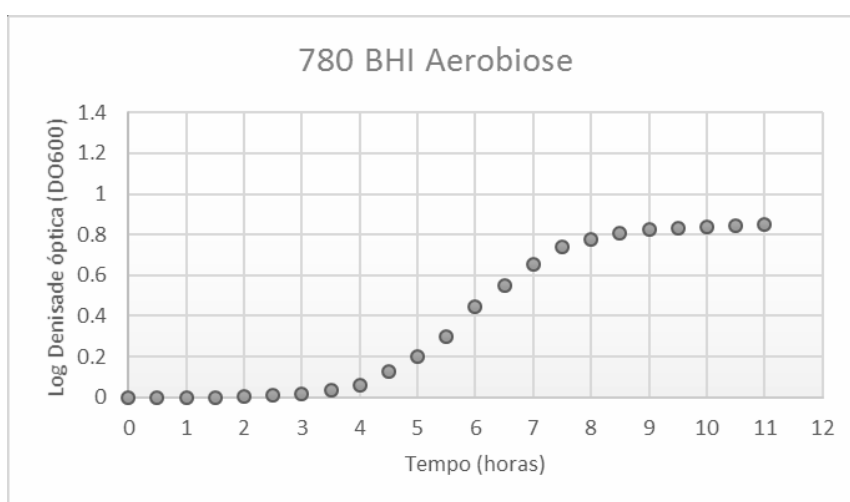
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

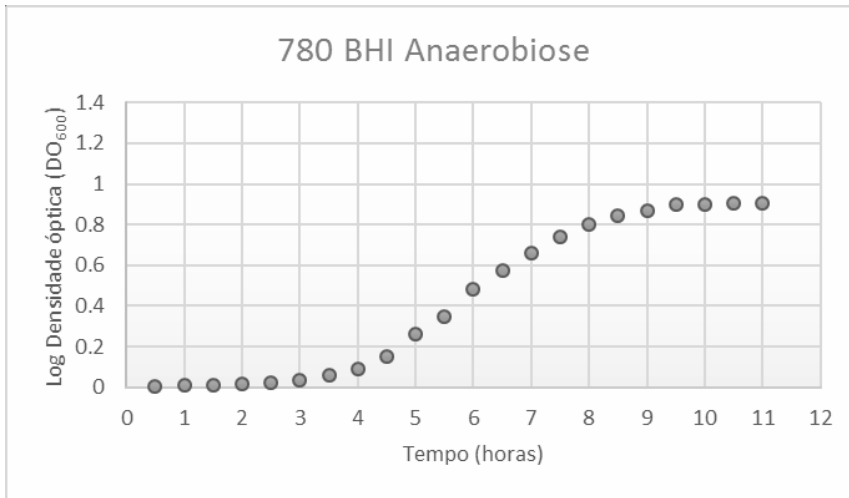
### 4.1. Avaliação do crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 em condições de aerobiose e anaerobiose

*Actinobacillus pleuropneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa que pertence à família *Pasteurellaceae* e é o agente etiológico da pleuropneumonia suína. Nesta mesma família se encontra a bactéria patogênica do trato respiratório de humanos, *H. influenzae*. Os microrganismos pertencentes a esta família são conhecidos por serem fastidiosos, ou seja, o seu metabolismo depende de um meio rico e da adição de fatores de crescimento como NAD (fator V) e hemina (fator X) (DALAI et al., 2009; WHITBY et al., 2013).

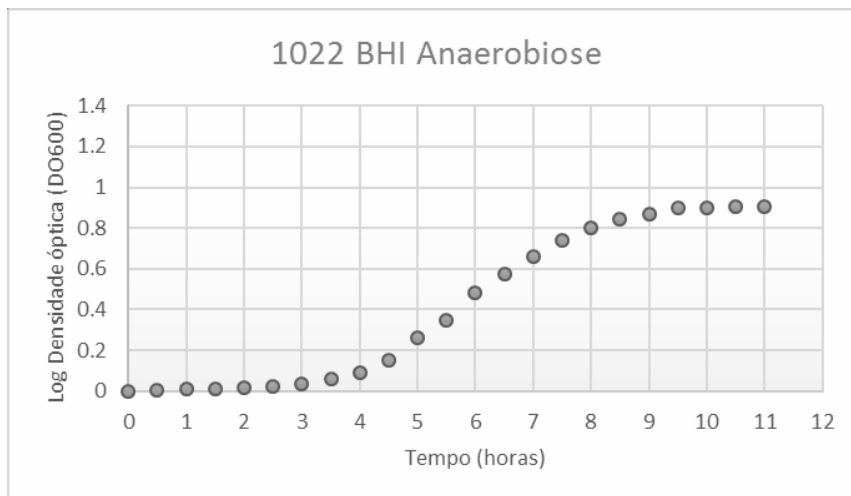
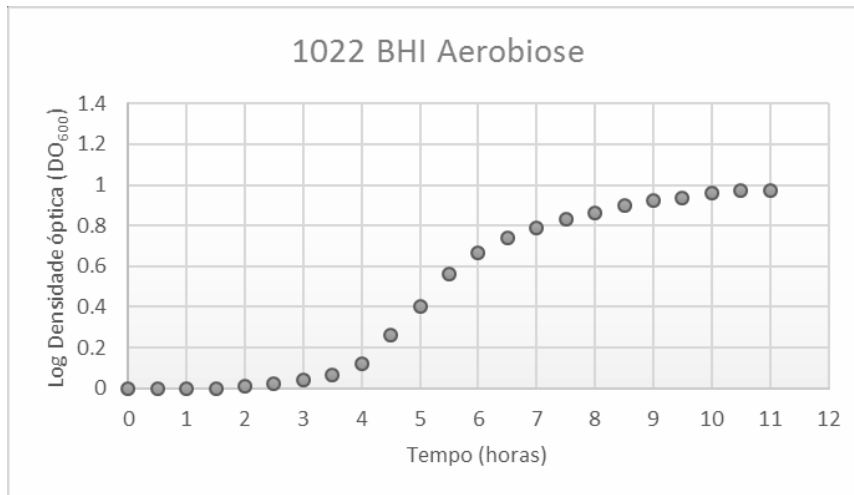
O crescimento de isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 foi avaliado em caldo BHI, caldo BHI acrescido de glicose e caldo BHI acrescido de galactose, em aerobiose e em anaerobiose, à 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5%. Os isolados clínicos 780 e o 1022, considerados os de menor e maior virulência em ensaio de infecção realizado em *G. mellonella*, bem como a linhagem referência do sorotipo 8 foram utilizadas neste ensaio. A Figura 4 apresenta a curva de crescimento obtida pelas linhagens investigadas em caldo BHI, em aerobiose e anaerobiose.

A

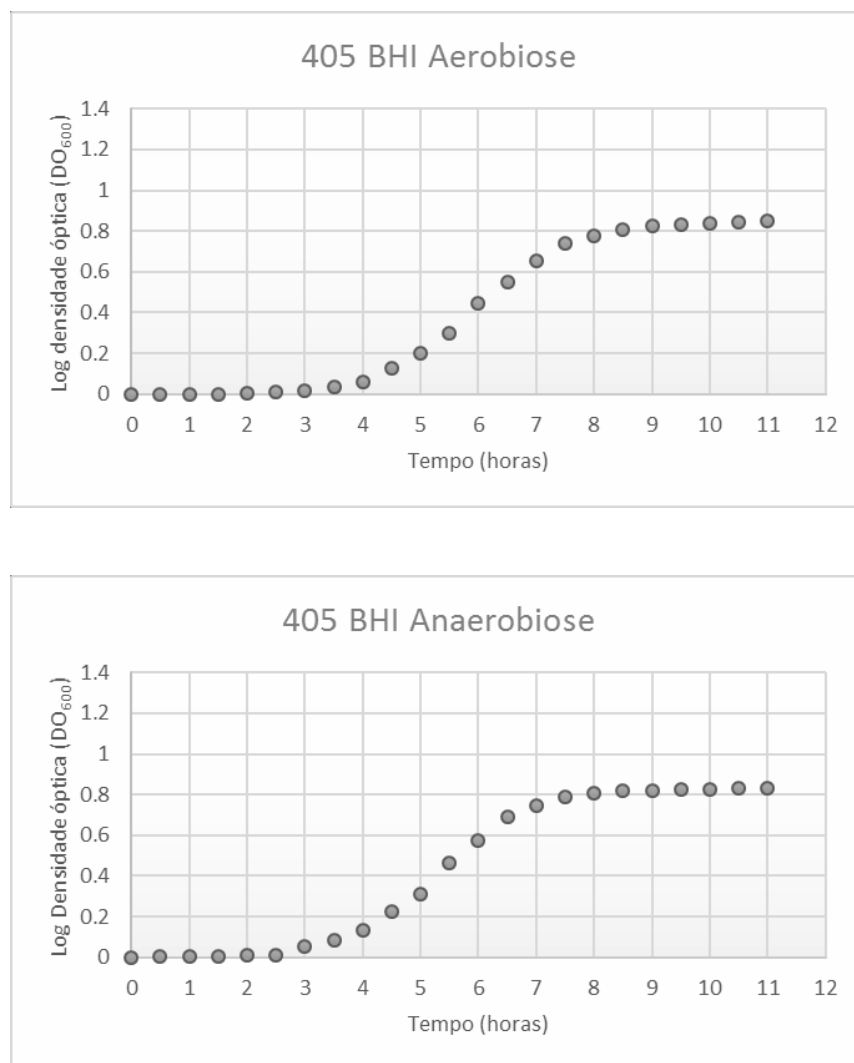




**B**



C

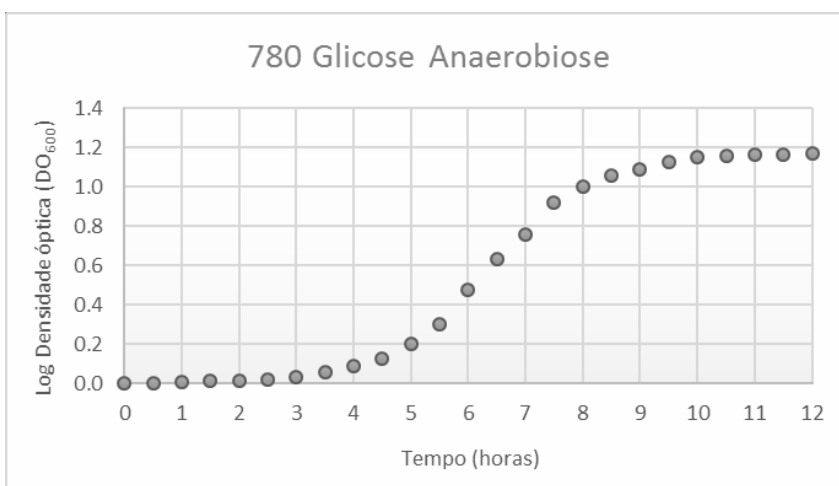
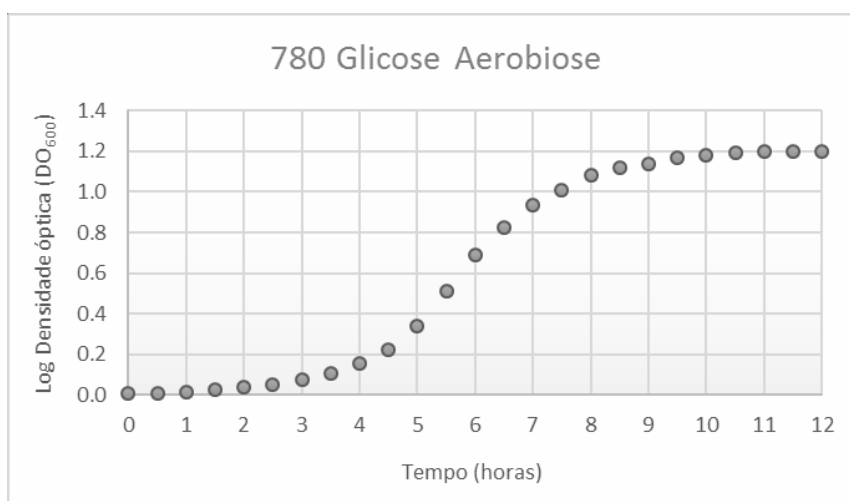


**Figura 4. Caracterização do crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* cultivados em caldo BHI, sob aerobiose e anaerobiose.** A. Curva de crescimento do isolado clínico 780. B. Curva de crescimento do isolado clínico 1022. C. Curva de crescimento da linhagem referência.

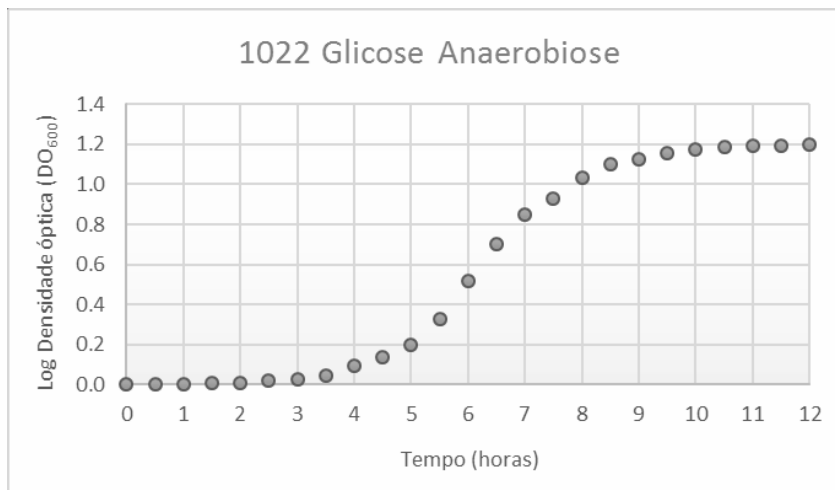
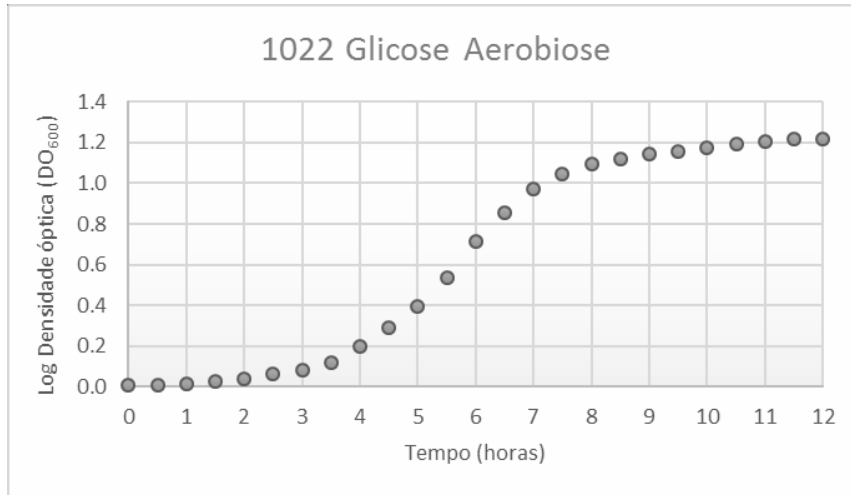
O perfil de crescimento, em caldo BHI, apresentado pelos três isolados foi similar (Figura 4), com o isolado 1022 apresentando uma curva de crescimento diferente quando comparada com o isolado 780 e à linhagem referência. É possível observar ainda que o isolado 1022 apresentou o início da sua fase exponencial, nas duas concentrações de oxigênio, em tempos similares. Entretanto, pode-se observar que os isolados apresentaram curvas similares, entre si, quando comparadas as condições de oxigênio. O próprio crescimento bacteriano é capaz de diminuir a

disponibilidade de oxigênio nos pulmões (BUETTNER et al., 2008), propiciando condição de anaerobiose. O crescimento das linhagens de forma similar pode ter sido influenciado pela grande quantidade de açúcares presentes no meio de cultura. Para melhor investigação do crescimento das linhagens de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8, estas foram investigadas em caldo BHI acrescido de glicose e caldo BHI acrescido de galactose (Figuras 5 e 6).

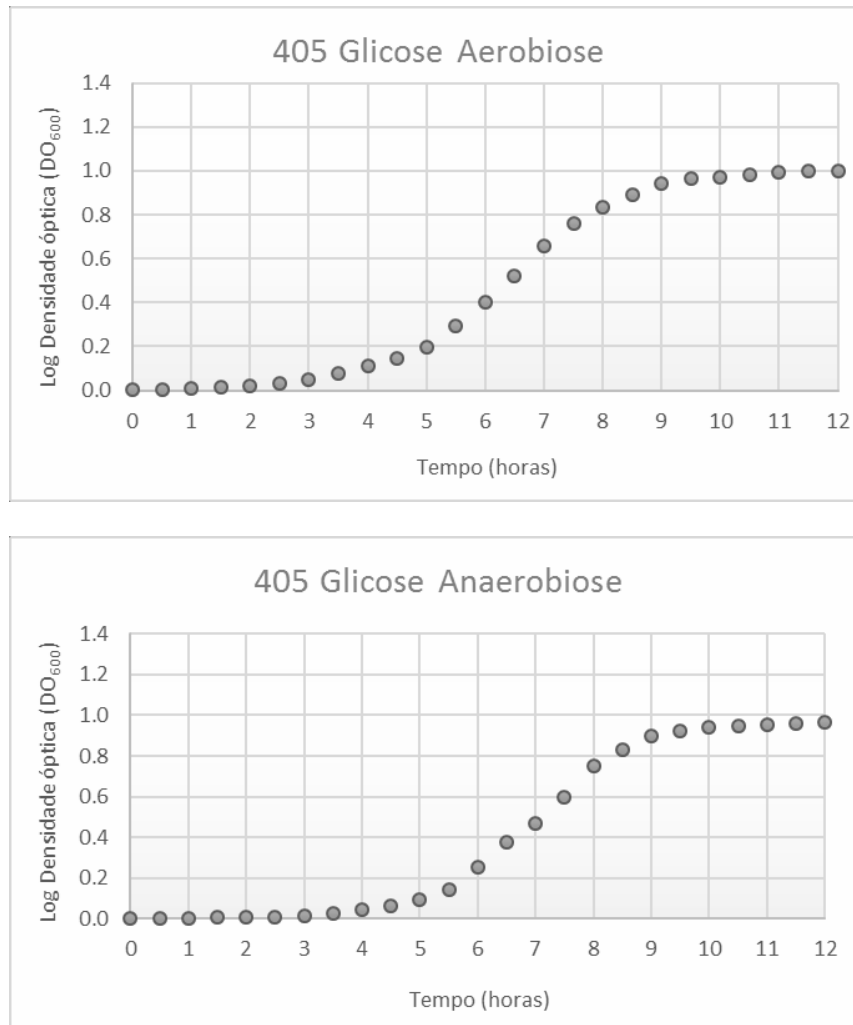
A



B

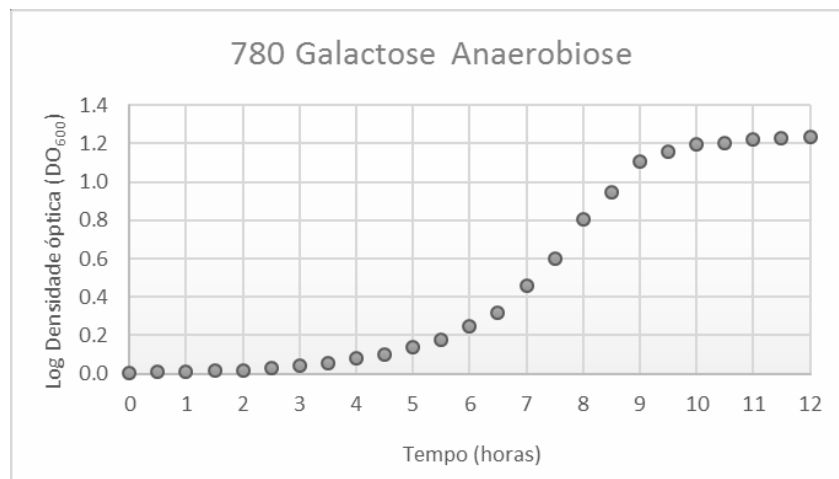
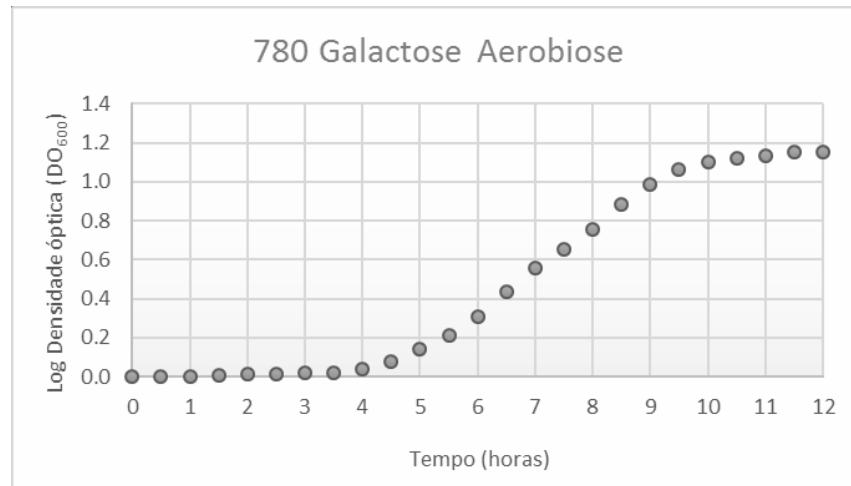


C

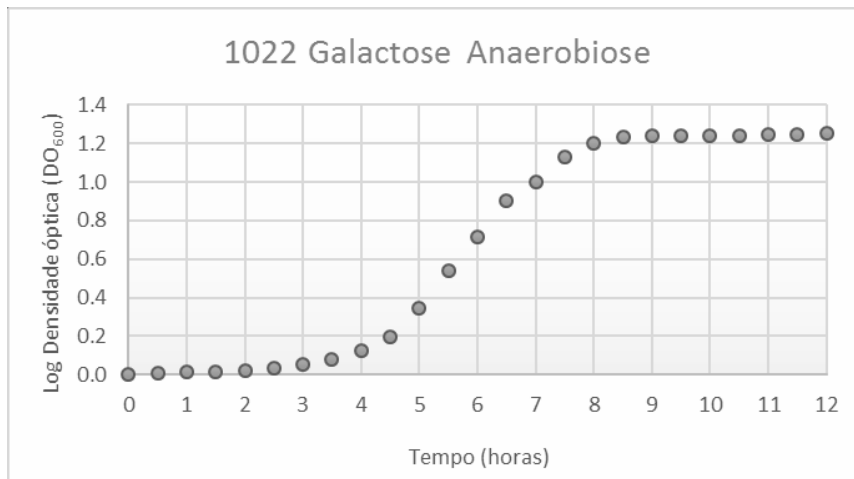
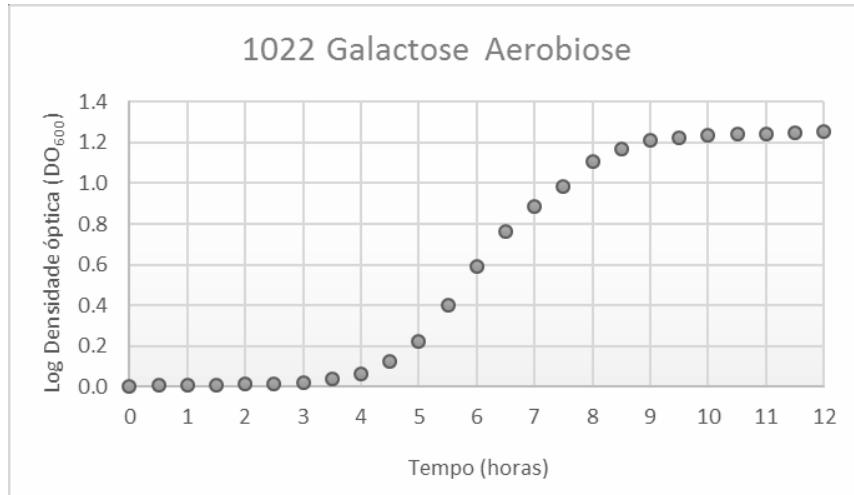


**Figura 5. Caracterização do crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* cultivados em caldo BHI acrescido de glicose. A. Curva de crescimento do isolado clínico 780. B. Curva de crescimento do isolado clínico 1022. C. Curva de crescimento da linhagem referência.**

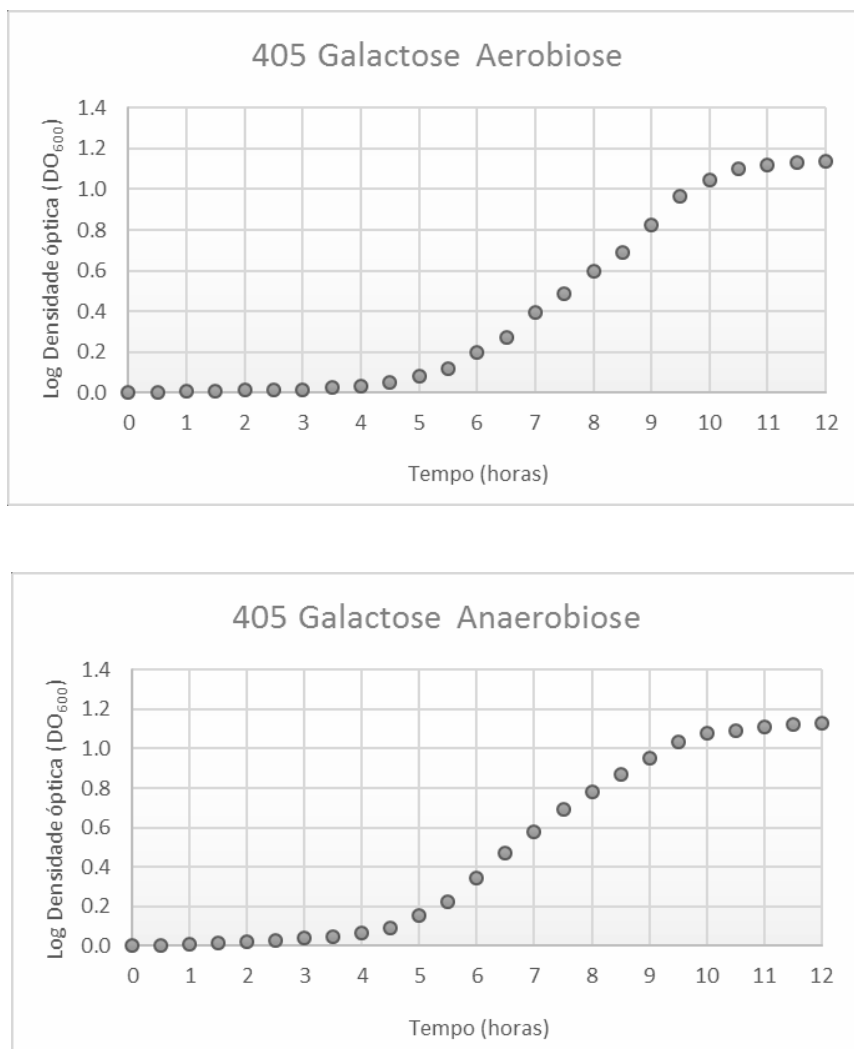
A



B



C



**Figura 6. Caracterização do crescimento dos isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* cultivados em caldo BHI acrescido de galactose.** A. Crescimento do isolado clínico 780. B. Crescimento do isolado clínico 1022. C. Crescimento da linhagem referência.

A glicose é um açúcar comumente utilizado como fonte primária de carbono no metabolismo bacteriano. Entretanto, a glicose não é encontrada em altas concentrações nos pulmões suínos, assim como também não são encontrados todos os demais nutrientes necessários para o metabolismo (KLITGAARD et al., 2012). Portanto, o presente estudo não reflete as condições nutricionais encontradas por *A. pleuropneumoniae* nos pulmões suínos. Para isto seria

necessário o crescimento dos isolados em meio quimicamente definido (LI et al., 2015). É possível observar que os valores da densidade óptica apresentados pelos isolados, tanto em aerobiose e anaerobiose, quando suplementado glicose (Figura 5) e galactose (Figura 6) foram maiores quando comparados com o crescimento somente em caldo BHI (Figura 4).

A escolha da galactose para o crescimento dos isolados nas duas condições de disponibilidade de oxigênio escolhidas foi feita com base na composição da cápsula de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 (ALTMAN et al., 1988). O crescimento em galactose foi observado, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, para os três isolados. Este fato permite concluir que estão presentes no genoma dos isolados JL03 do sorotipo 3 e L20 do sorotipo 5b, os genes responsáveis por codificar as enzimas da via de Leloir. Estes isolados tiveram analisados genoma e transcriptoma (XU et al., 2008). O crescimento em anaerobiose dos isolados de *A. pleuropneumoniae* confirma a sua capacidade de adaptação do metabolismo de acordo com a disponibilidade de oxigênio.

*A. pleuropneumoniae* se adere a células do trato respiratório inferior do hospedeiro utilizando adesinas. Após a adesão, a bactéria produz toxinas que levam ao rompimento da célula do hospedeiro, e desta forma consegue os nutrientes necessários para o seu metabolismo. Diante de uma limitação de nutrientes, foi sugerido que as moléculas sinais da resposta estrigente, (p)ppGpp, direta ou indiretamente afetam a patogênese do isolado S8 do sorotipo 7 de *A. pleuropneumoniae*. Estas moléculas contribuem para uma sobrevivência prolongada da bactéria em ambientes com limitação de nutrientes, uma vez que a resposta estrigente é um mecanismo bacteriano de resposta ao estresse provocado por esta limitação de nutrientes. Esta resposta leva ao início de mudanças na regulação gênica a fim de aumentar ao máximo a utilização dos nutrientes que estão disponíveis. A relação da resposta estrigente com o metabolismo está no fato de que bactérias, como *A. pleuropneumoniae* necessitem de uma variedade de nutrientes para crescimento e patogenicidade (LI et al., 2015).

#### 4.2. Determinação de parâmetros cinéticos do crescimento de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8

A determinação das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) dos isolados de *A. pleuropneumoniae* permite fazer uma distinção no perfil de crescimento entre os isolados. O

ensaio de infecção realizado em larvas de *Galleria mellonella* por Pereira e colaboradores (2015) demonstrou que existe diferença na virulência apresentada pelos isolados, 780 e 1022, que foram considerados o menos e o mais virulento, respectivamente, dentre os demais isolados clínicos investigados. Outro fator importante observado nesse estudo foi que o isolado 1022 consegue colonizar e se manter por mais tempo na larva levando, inclusive, com formação de nódulos, acúmulo de hemócitos e melanização, no entanto, o(s) fator (es) envolvidos nesta diferença não foram determinados.

Na tentativa de investigar diferenças que possam explicar a virulência entre os isolados clínicos investigados, as velocidades específicas de crescimento foram determinadas após 24 horas de crescimento em caldo BHI, em caldo BHI acrescido de glicose e caldo BHI acrescido de galactose para os isolados clínicos 780, 1022 e para a linhagem referência de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8.

Os resultados mostraram que a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) dos isolados foi diferente nas duas concentrações de oxigênio, e foi diferente também quando houve a adição dos dois açúcares. Em caldo BHI sem adição de açúcar, o isolado 1022 apresentou maior valor de  $\mu$  em relação aos isolados 780 e 405, tanto para o crescimento em aerobiose quanto para o crescimento em anaerobiose. Verificou-se também que o  $\mu$  para os três isolados foi diferente nas duas concentrações de oxigênio (Tabela 2).

Portanto, houve diferença significativa entre o  $\mu$  dos isolados 780 e 1022, em anaerobiose, tanto no crescimento em caldo BHI quanto no crescimento em caldo BHI acrescido de glicose ou galactose.

O mesmo padrão de crescimento pode ser observado quando são comparados os valores de  $\mu$  do crescimento em glicose e galactose. Embora esses açúcares sejam isômeros, o valor de  $\mu$  para os três isolados foi diferente nas condições investigadas. O isolado 780 apresentou um valor de  $\mu$  menor quando comparado ao isolado 1022, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Mas, os valores de  $\mu$  para o isolado 780 são maiores do que aqueles encontrados para a linhagem referência, tanto no crescimento em glicose quanto em galactose, e nas duas concentrações de oxigênio.

O pH inicial de cada isolado foi 7,2, que é o valor de pH indicado pelo fabricante para o caldo BHI. Verificou-se que houve uma queda no pH de todos os três isolados após 24 horas,

tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Esta queda foi observada tanto em caldo BHI sem adição de açúcar quanto em caldo BHI acrescido de glicose ou galactose. Entretanto, não houve diferença significativa no pH para os três isolados, em aerobiose e em anaerobiose, apesar do tipo de fermentação de *A. pleuropneumoniae* ser do tipo mista como acontece com *A. succinogenes*, outra espécie do gênero *Actinobacillus* (MCKINLAY et al., 2010). Os ácidos encontrados durante o crescimento das linhagens de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 foram os mesmos, o que pode explicar o pH final encontrado não possuir diferença significativa entre as linhagens. A Tabela 2 mostra os valores de  $\mu$  encontrados para os três isolados após o crescimento de 24 horas nas condições citadas acima; bem como o pH inicial e o pH final de cada isolado.

**Tabela 2.** Velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) em caldo BHI, caldo BHI acrescido de glicose e galactose, e pH final em condições de aerobiose e anaerobiose

	MV 780			MV 1022			Referência 405		
	Aerobiose	Anaerobiose	p valor	Aerobiose	Anaerobiose	p valor	Aerobiose	Anaerobiose	p valor
$\mu$	0,130±0,002	0,082±0,003	0,004	0,139±0,002	0,097±0,002	0,003	0,111±0,002	0,081±0,001	0,005
pH <sub>i</sub> <sup>a</sup>	7,2	7,2	-	7,2	7,2	-	7,2	7,2	-
pH <sub>f</sub>	6,35	6,25	0,181	6,17	6,28	0,181	6,45	6,33	0,181
$\mu_{gli}$	0,146±0,001	0,137±0,001	0,017	0,151±0,002	0,144±0,001	0,012	0,110±0,001	0,094±0,001	0,088
pH <sub>i</sub>	7,2	7,2	-	7,2	7,2	-	7,2	7,2	-
pH <sub>f</sub>	4,65	4,46	0,200	4,72	4,37	0,200	4,72	4,77	0,200
$\mu_{gal}$	0,127±0,001	0,090±0,002	0,001	0,171±0,002	0,152±0,002	0,014	0,071±0,002	0,064±0,002	0,063
pH <sub>i</sub>	7,2	7,2	-	7,2	7,2	-	7,2	7,2	-
pH <sub>f</sub>	4,94	5,12	0,633	4,95	5,00	0,633	5,51	5,61	0,633

<sup>a</sup> pH<sub>i</sub>: pH inicial  
pH<sub>f</sub>: pH final  
gli: glicose  
gal: galactose

<sup>b</sup> p valor para o  $\mu$  entre os isolados 780 e 1022 no crescimento em caldo BHI em anaerobiose foi 0,009.

<sup>c</sup> p valor para o  $\mu$  entre os isolados 780 e 1022 no crescimento em caldo BHI acrescido de glicose em anaerobiose foi 0,038.

<sup>d</sup> p valor para o  $\mu$  entre os isolados 780 e 1022 no crescimento em caldo BHI acrescido de galactose em anaerobiose foi 0,002.

#### 4.3. Avaliação da produção de ácidos orgânicos por *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8

A capacidade de *A. pleuropneumoniae* em adaptar o seu metabolismo de acordo com as condições do ambiente é importante para a colonização e permanência em seu hospedeiro. Os

resultados obtidos por *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 em relação à produção de ácidos orgânicos indicam que a bactéria direciona o seu metabolismo em diferentes concentrações de oxigênio.

A Tabela 3 mostra a produção de ácidos orgânicos após 24 horas de crescimento em caldo BHI sem e com o acréscimo de fonte adicional de carbono (Tabelas 4 e 5).

A produção de ácidos orgânicos em aerobiose foi cerca de 90 % menor quando comparada com a produção dos ácidos em anaerobiose, para os três isolados. O isolado 1022 mostrou maior produção de ácido láctico, em relação ao isolado 780 e à linhagem referência, em anaerobiose. A produção de ácidos orgânicos também foi maior para o isolado 1022 (Tabela 3). Houve diferença significativa na produção dos ácidos orgânicos, nos três isolados, em anaerobiose. A mesma análise não foi feita em aerobiose devido à não produção do ácido láctico nesta condição. Entretanto, houve diferença significativa na produção de ácido láctico pelos isolados 780 e 1022 em anaerobiose.

**Tabela 3.** Produção de ácidos orgânicos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* cultivado em caldo BHI/NAD

Ácidos (mmol/L)	MV 780		<i>p</i> valor	MV 1022		<i>p</i> valor	Referência 405		<i>p</i> valor
	Aerobiose	Anaerobiose		Aerobiose	Anaerobiose		Aerobiose	Anaerobiose	
Ácido succínico	0,20	8,37	0,001	0,54	5,06	0,001	0,32	11,8	0,012
Ácido láctico <sup>a</sup>	0	7,51	0	0	24,31	0	0	0,74	0
Ácido acético	0,33	6,52	0,076	0,97	8,60	0,001	0,55	9,14	0,002
Ácido isobutírico	1,50	1,52	0,17	2,72	1,95	0,001	1,26	2,6	0,003
Total	2,19	23,92		4,21	39,92		3,57	29,55	

<sup>a</sup> não houve produção de ácido láctico em condições de aerobiose.

<sup>b</sup> *p* valor para a produção de ácido láctico entre o isolado 780 e o isolado 1022 foi 0,000.

<sup>c</sup> *p* valor para a produção de ácidos orgânicos em anaerobiose para os 3 isolados foi 0,001.

O isolado 1022 apresentou maior produção de ácidos orgânicos em comparação ao isolado 780 e à linhagem referência no crescimento em caldo BHI acrescido de glicose, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Houve maior produção de ácido acético em aerobiose, enquanto que em anaerobiose houve maior produção de ácido láctico. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa na produção do ácido láctico entre os isolados 1022 e 780, em anaerobiose nas condições investigadas. Entretanto, houve diferença significativa na produção de ácido acético, em aerobiose, entre os mesmos isolados. A linhagem referência apresentou menor produção de ácidos orgânicos quando comparada aos isolados 780 e 1022, sendo que somente a produção do ácido succínico apresentou diferença significativa entre as condições investigadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Produção de ácidos orgânicos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* cultivado em BHI/NAD suplementado com glicose

Ácidos (mmol/L)	MV 780		p valor	MV 1022		p valor	Referência 405		p valor
	Aerobiose	Anaerobiose		Aerobiose	Anaerobiose		Aerobiose	Anaerobiose	
Ácido succínico	1,98	4,27	0,179	1,88	5,28	0,008	1,14	4,21	0,163
Ácido láctico	11,42	20,18 <sup>a</sup>	0,004	5,15	21,45 <sup>a</sup>	0,016	2,71	14,20	0,035
Ácido acético	12,61 <sup>b</sup>	3,19	0,013	18,54 <sup>b</sup>	3,72	0,001	14,04	2,99	0,137
Ácido isobutírico	0,70	1,06	0,189	0,74	1,54	0,218	0,69	1,21	0,394
Total	26,71	28,70		26,31	31,99		18,58	22,61	

<sup>a</sup>p valor para a produção de ácido láctico em anaerobiose entre os isolados 780 e 1022 foi 0,067.

<sup>b</sup>p valor para a produção do ácido acético em aerobiose entre os isolados 780 e 1022 foi 0,004.

Estudo semelhante realizado em *H. influenzae* Rd KW20 e *H. influenzae* 2019 também mostraram uma mudança no padrão de produção de ácidos orgânicos. Neste estudo, o crescimento das linhagens foi realizado em aerobiose e anaerobiose, sendo que para essas linhagens a produção de ácido acético e ácido fórmico variou de acordo com a diminuição da concentração de oxigênio. Uma maior produção de ácido acético foi observada em aerobiose, e

em anaerobiose houve maior produção de ácido fórmico. A produção destes ácidos, em cada condição, permite identificar as vias metabólicas utilizadas. Em aerobiose, o piruvato foi convertido em ácido acético via formação do acetil fosfato, e em anaerobiose o piruvato foi convertido a ácido fórmico através da ação da enzima piruvato formato liase (OTHMAN, 2014).

Os três isolados, crescendo em meio suplementado com galactose, produziram quantidades diferentes de ácido acético em aerobiose, sendo que o isolado 1022 apresentou maior produção deste ácido em relação ao isolado 780 e à linhagem referência. Houve diferença significativa na produção do ácido acético entre os isolados 780 e 1022, considerados os de menor e maior virulência no ensaio de infecção realizado em *G. mellonella* (PEREIRA et al., 2015). Houve uma alteração no padrão de produção dos ácidos em anaerobiose. Nesta condição houve maior produção de ácido láctico para os três isolados, mas não houve diferença significativa na produção deste ácido entre o isolado 780 e 1022.

**Tabela 5.** Produção de ácidos orgânicos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* cultivado em BHI/NAD suplementado com galactose

Ácidos (mmol L <sup>-1</sup> )	MV 780		p valor	MV 1022		p valor	Referência 405		p valor
	Aerobiose	Anaerobiose		Aerobiose	Anaerobiose		Aerobiose	Anaerobiose	
Ácido succínico	1,31	4,97	0,022	1,18	5,52	0,005	0,52	4,97	0,016
Ácido láctico	0,64	16,25 <sup>a</sup>	0,008	0,21	17,79 <sup>a</sup>	0,001	0,31	12,50	0,050
Ácido acético	20,09 <sup>b</sup>	3,80	0,001	21,01 <sup>b</sup>	4,25	0,014	11,61	3,83	0,008
Ácido propiônico	3,20	2,49	0,323	1,53	2,67	0,514	2,84	2,68	0,013
Ácido isobutírico	0,78	1,09	0,643	0,53	1,45	0,001	0,54	0,82	0,648
Total	26,02	28,60		23,46	31,68		15,82	24,80	

<sup>a</sup> p valor para a produção de ácido láctico em anaerobiose entre os isolados 780 e 1022 foi 0,059.

<sup>b</sup> p valor para a produção do ácido acético em aerobiose entre os isolados 780 e 1022 foi 0,017.

Li e colaboradores (2014) realizaram um estudo com a linhagem referência do sorotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* com a finalidade de verificar se haveria mudança na expressão gênica quando a bactéria teve suas condições de cultivo modificadas. O crescimento foi realizado em condições de aerobiose e anaerobiose, e foi observada a mudança na expressão de genes quando a

concentração de oxigênio diminuiu no meio. Apesar de possuir um ciclo do ácido tricarbóxico incompleto (XU et al., 2008), os genes que codificam enzimas para a fermentação estão presentes no genoma de *A. pleuropneumoniae*. O gene da enzima *L*-lactato desidrogenase foi encontrado *up*-regulado, sendo esta enzima responsável pela conversão do piruvato a lactato. Houve quantificação da concentração dos ácidos orgânicos no sobrenadante da cultura, e o ácido láctico foi encontrado em maior quantidade em anaerobiose, assim como o ácido acético. A detecção e quantificação desses produtos do metabolismo possibilitaram a indicação de que *A. pleuropneumoniae* utiliza a glicólise, metabolismo do piruvato e fermentação para obtenção de energia durante o crescimento em condições de anaerobiose.

A Tabela 3 do presente trabalho também mostra uma maior produção do ácido acético em anaerobiose para os três isolados do sorotipo 8 de *A. pleuropneumoniae*. Entretanto, esta condição não pode ser observada quando o crescimento dos isolados foi realizado em caldo BHI suplementado com glicose e galactose (Tabelas 4 e 5). Nos últimos casos, a maior produção em anaerobiose foi de ácido láctico. Em bactérias da espécie *H. influenzae* tipo b (Hib) foi comprovado que o lactato pode ser usado como única fonte de carbono para o metabolismo, visto que este composto orgânico encontra-se disponível na saliva, mucosas e no sangue circulante (LICHTENEGGER et al., 2014). Alguns estudos realizados na década de 1990 indicam que existe uma relação entre o metabolismo do lactato e a virulência de *H. influenzae* (KURATANA et al., 1990; KURATANA, ANDERSON, 1991).

Estudos realizados por Atack e colaboradores (2014) indicaram que a presença de lactato é importante para a virulência de *Neisseria gonorrhoeae* 1291 durante a infecção e colonização, sendo o lactato substrato para a síntese de ácidos siálicos que compõem o lipoligossacarídeo. Entretanto, o mesmo não acontece em *H. influenzae* (LICHTENEGGER et al., 2014). A adição de ácidos siálicos à estrutura de lipoligossacarídeos foi considerada importante porque ajuda a prevenir o reconhecimento do lipoligossacarídeo, presente na membrana externa, por anticorpos presentes no soro do hospedeiro. Anticorpos estes produzidos pelo sistema imune em resposta à presença bacteriana (CLARK et al., 2013).

Alguns microrganismos possuem a capacidade de oxidar o ácido láctico gerado no metabolismo a ácido propiônico, ácido acético, CO<sub>2</sub> e ATP. Uma forma de gerar acetato pela célula microbiana é pela oxidação do lactato a piruvato: primeiramente, o piruvato vai ser

oxidado a acetil-CoA e CO<sub>2</sub>, depois o acetil-CoA vai ser convertido em ácido acético. Sempre que o microrganismo cresce em glicose e utiliza a via glicolítica, a produção de ácido acético está acompanhada da geração de duas moléculas de ATP. Os açúcares utilizados como suplementação ao caldo BHI, glicose e galactose, são oxidados a piruvato durante a glicólise. O piruvato gerado com esta oxidação pode seguir três caminhos alternativos. No primeiro caminho, o piruvato é completamente oxidado a CO<sub>2</sub> e os elétrons gerados ao longo da glicólise serão passados até o O<sub>2</sub> através de uma cadeia respiratória. O segundo caminho é aquele em que o piruvato é reduzido a ácido láctico, um ácido orgânico. No terceiro caminho o piruvato pode ser convertido a etanol (NELSON & COX, 2014). O importante é notar que os ácidos orgânicos são produtos do metabolismo de *A. pleuropneumoniae*.

Ainda em relação ao metabolismo do ácido acético, a enzima álcool desidrogenase é responsável por converter o acetaldeído que resulta da descarboxilação do piruvato, pela piruvato descarboxilase, em etanol. No sentido inverso é utilizado um aldeído, ou uma cetona, durante a fermentação como forma de regenerar o NADH a NAD<sup>+</sup>. O gene da álcool desidrogenase é regulado pela presença de glicose no meio (WALES & FEWSON, 1994; BAPTISTA et al., 2005).

A análise da produção de ácidos orgânicos pelos isolados clínicos permitiu observar que a produção de ácido láctico correspondeu a mais de 50% da produção total dos ácidos (Tabelas 3, 4 e 5), principalmente no isolado 1022 (61% em BHI, 67% em BHI acrescido de glicose e 54% em BHI acrescido de galactose). A análise dos cromatogramas mostrou que houve um pico, antes do pico da glicose, que não foi identificado pela cromatografia líquida de alta eficiência, sendo necessária outra análise para identificação desse produto do metabolismo. Os cromatogramas mostraram ainda que houve uma co-eluição de outro produto com o ácido propiônico, por isso não foi possível realizar a quantificação deste ácido no presente trabalho.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 8 utilizados no trabalho apresentaram diferença no crescimento quando comparadas as condições de aerobiose e anaerobiose. A condição de anaerobiose é encontrada pela bactéria nos pulmões do hospedeiro suíno. Houve diferença também no crescimento dos isolados em caldo BHI em relação ao crescimento em caldo BHI acrescido de glicose e caldo BHI acrescido de galactose, observando-se maior velocidade específica de crescimento quando o meio foi suplementado com esses açúcares. Entre as linhagens utilizadas, o isolado 1022 apresentou maior velocidade específica de crescimento em relação ao isolado 780 e à linhagem referência 405.

Na produção de ácidos orgânicos foi observada uma mudança no padrão dos ácidos em aerobiose quando comparada com anaerobiose, nos três isolados, tanto no caldo BHI quanto no caldo BHI suplementado com glicose ou galactose.

Neste sentido, novos estudos devem ser realizados utilizando mais isolados clínicos de *A. pleuropneumoniae* do sorotipo 8 de *A. pleuropneumoniae* para verificar se o mesmo padrão obtido neste trabalho é observado nos demais isolados que apresentam semelhantes perfis de virulência *G. mellonella*. Além disso, estudos visando a investigação do proteoma e metaboloma dos isolados de maior e menor virulência são necessários com a finalidade de confirmar a influência do metabolismo na patogenicidade de *A. pleuropneumoniae*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJITO, T.; HAGA, Y.; HOMMA, S.; GORYO, M.; OKADA, K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Journal of Veterinary Medical Science**, n. 4, v. 58, p. 297-303. 1996.
- ALTMAN, E.; BRISSON, JB.; PERRY, M. B. Structural characterization of the capsular polysaccharide and O-chain of the lipopolysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 8 (strain 405). **Canadian Journal of Chemistry**, n. 68, p. 329-334. 1990
- ANASTÁCIO, A. Microbiologia preditiva alimentar. **Segurança e qualidade alimentar**, n.7. 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/suinoicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acesso em 12 ago 2015.
- BANDARA, A. B.; LAWRENCE, M. L.; VEIT, H. P.; INZANA, T. J. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. **Infection and Immunity**, n. 71, p. 3320-3328. 2003.
- BELANGER, M.; BEGIN, C.; JACQUES, M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 656-662. 1995.
- BOSSÉ, J. T.; MACINNES, J. I. Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 3, n. 64, p. 145-150. 2000.
- BOSSÉ, J. T.; GILMOUR, H. D.; MACINNES, J. I. Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1242-1247. 2001.
- BOSSÉ, J. T.; JANSON, H.; SHEEHAN, B. J.; BEDDEK, A.J.; ANDREW, N. R.; KROLL, J. S.; LANGFORD, P. R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. **Microbes and infection**, v. 4, p. 225 – 235. 2002.

BOSSÉ, J. T.; CHAUDHURI, R. R.; LI, Y.; LEANSE, L. G.; CRESPO, R. F.; COUPLAND, P.; HOLDEN, M. T. G.; BAZZOLLI, D. M.; MASKEL, D. J.; TUCKER, A. W.; WREN, B. W.; RYCROFT, A. N.; LANGFORD, P. R. Complete genome sequence of MIDG2331, a genetically tractable serovar 8 clinical isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Genome Announcements (American Society for Microbiology)**, v. 4, n. 1, p. 1-2. 2016.

BREN, A.; HART, Y.; DEKEL, E.; KOSTER, D.; ALON, U. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. **BMC Systems Biology**, v. 27, n. 7, p. 2-9. 2013.

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

CHAI, Y.; BEAUREGARD, P. B.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **MBio**, v. 3, n. 4, p. 1- 11. 2012.

CHIERS, K.; WAELE, T.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. **Veterinary Research**, v. 65, n. 41, p. 1-16. 2010.

CHUBUKOV, V.; GEROSA, L.; KOCHANOWSKI, K.; SAUER, U. Coordination of microbial metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 327-340. 2014.

CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. **Taxonomy and biodiversity of members of *Pasteurellaceae*** in: *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. 3<sup>a</sup> Ed. Norfolk: Caister Academic Press. 536 p. 2008.

COOPER, M.; TAVANKAR, G. R.; WILLIAMS, H. D. Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, n. 149, p. 1275-1284. 2003.

- CRUIJSEN, T.; VAN LEENGOED, L. A.; HAM-HOFFIES, M.; VERHEIJDEN, J. H. Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. **Infection and Immunity**, n. 6, v. 63, p. 2341-2343. 1995.
- DOM, P.; HAESNBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; CHARLIER, G. In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. **Infection and Immunity**, n. 60, p. 4328-4334. 1994.
- EISENREICH, W.; DANDEKAR, T.; HEESEMANN, J.; GOEBEL, W. Carbon metabolism of intracellular pathogens and possible links to virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 401-412. 2010.
- FINKEL, S. E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 113-120. 2006.
- FREY, J. The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 51-58. 2011.
- FREY, J.; KUHNET, P. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 292, p. 149-158. 2002.
- FREY, J.; BOSSE, J. T.; CHANG, Y. F.; CULLEN, J. M.; FENWICK, B.; GERLACH, G. F.; GYGI, D.; HAESNBROUCK, F.; INZANA, T. J.; JANSEN, R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. **Journal of General Microbiology**, v. 8, n. 139, p. 1723-1728. 1993.
- FREY, P. A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. **The FASEB**, v. 10. 1996.
- GARVIE, E. I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 1, p. 106- 139. 1980.

GAWTHORNE, J. A.; TAN, N. Y.; BAILEY, UM.; DAVIS, M. R.; WONG, L. W.; NAIDU, R.; FOZ, K. L.; JENNINGS, M. P.; SCHULZ, B. J. Selection against glycosylation sites in potential target proteins of the general HMWC N-glycosyltransferase in *Haemophilus influenzae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 445, p. 633-638. 2014.

GEIGER, T.; GOERKE, C.; FRITZ, M.; SCHAFFER, T.; OHLSEN, K.; LIEBEKE, M. Role of (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 1873-1883. 2010.

GONZALEZ, F. J.; FERNANDEZ-SALGUERO, P.; LEE, S. S. T.; PINEAU, T.; WARD, J. M. Xenobiotic receptor knockout mice. **Toxicology Letters**, v. 83, n. 82, p. 117-121. 1995.

GUO, A. C.; JEWISON, T.; WILSON, M.; LIU, Y.; KNOX, C.; DJOUMBOU, Y.; LO, P.; MANDAL, R.; KRISHNAMURTHY, R.; WISHART, D. S. ECMDB: The *E. coli* metabolome database. **Nucleic Acids Research**, v. 41, P. 625-630. 2013.

HANSEN, M. J.; BERTELSEN, M. F.; DIETZ, R.; SONNE, C.; BOJESSEN, A. A simple and novel method for retrieval of *Pasteurellaceae* from swab samples collected in the field. **Microbiology Open**, v. 2, n. 5, p. 795 – 797. 2013.

HEMPEL, R. J.; MORTON, D. J.; SEALE, T. W.; WHITBY, P. W.; STULL, T. L. The role of the RNA chaperone Hfq in *Haemophilus influenzae* pathogenesis. **BioMed Central**, v. 134, n. 13, p. 1-10. 2013.

HOLDEN, H. M.; RAYMENT, I.; THODEN, J. B. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p.43885-43888. 2003.

HU, X.; YAN, H.; LIU, K.; HU, J.; QI, C.; YANG, J.; LIU, Y.; ZHAI, J.; LIU, J. Identification and characterization of a novel stress-responsive outer membrane protein Lip40 from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **BioMed Central**, v. 106, n. 15, p. 2-11. 2015.

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

JACKSON, J. B. Proton translocation by transhydrogenase. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, n. 545, p. 18-24. 2003.

JACQUES, M.; FOIRY, B.; HIGGINGS, R.; MITTAL, K. R. Electron microscopic examination of capsular material from various serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 3314-3318. 1998.

JARMA, E.; REGASSA, L. B. Growth phase mediated regulation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI and ApxII toxins. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, p. 197-203. 2003.

JARMA, E., CORRADINO, G., REGASSA, L. B. Anaerobiosis, growth phase and *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX production. **Microbial Pathogenesis**, n. 37, p. 29-33. 2004.

JESSING, S. G.; AHRENS, P.; INZANA, T. J.; ANGEN, O. The genetic organization of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7 and 12. **Veterinary Microbiology**, n. 19, p. 350-359. 2008.

JÖERS, A.; TENSON, T. Growth resumption from stationary phase reveals memory in *Escherichia coli* cultures. **Nature - Scientific Reports**, p. 1-11. 2016.

KAZMIERCZAK, K. M.; WAYNE, K. J.; RECHTSEINER, A.; WINKLER, M. E. Roles of rel(Spn) in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* D39. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 590-611. 2009.

KICH, J. D.; KUCHIISHI, S. S.; MORES, M. A. Z.; DE LARA, A. C. Agentes bacterianos de pneumonia associados a infecções por *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 17 – 27. 2010.

KLINKENBERG, L. G.; LEE, J. H.; BISHAI, W. R., KARAKOUSIS, P. C. The stringent response is required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. **Journal of Infection Diseases**, v. 202, n. 9, p. 1397-1404. 2010.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 124-127. 2005.

KUHNERT, P.; SCHOLTEN, E.; HAEFNER, S.; MAYOR, D.; FREY, J. *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 44-50. 2010.

KURATANA, M., HANSEN, E. J., ANDERSON, P. Multiple mechanisms in serum factor-induced resistance of *Haemophilus influenzae* type b to antibody. **Infection and Immunity**, v. 52, n. 4, p. 914-919. 1990.

KURATANA, M., ANDERSON, P. Host metabolites that phenotypically increase the resistance of *Haemophilus influenzae* type B to clearance mechanisms. **Journal of Infectious Diseases**, n. 163, p. 1073-1079. 1991.

LANG, K. Metabolic engineering of *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as platform biocatalyst for the production of isobutyric acid and other secondary metabolites. **Microbial Cell Factories**, v.2, n. 13. 2014.

LANGFORD, P. R.; LOYNDS, B. M.; KROLL, J. S. Cloning and molecular characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Infection and Immunity**, n. 12, v. 64, p. 5035-5041. 1996.

LAPOINTE, C. F.; TAYLOR, R. F. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 1502-1510. 2009.

LICHTENEGGER, S.; BINA, I.; ROIER, S.; BAUERNFEIND, S.; KEIDEL, K.; SCHILD, S.; ANTHONY, M.; REIDI, J. Characterization of lactate utilization and its implication on the

physiology of *Haemophilus influenzae*. **International Journal of Medical Microbiology**, n 304, p. 490-498. 2014.

LI, G.; XIE, F.; ZHANG, Y.; BOSSÉ, J. T.; LANGFORD, P. R.; WANG, C. Role of (p)ppGpp in viability and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* S8. **Plos one**, v. 10, n. 10, p. 1-17. 2015.

LI, L.; ZHU, J.; YANG, K.; XU, Z.; LIU, Z.; ZHOU, R. Changes in gene expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in response to anaerobic stress reveal induction of central metabolism and biofilm formation. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 473-481. 2014

LI, L.; CHEN, Z.; BEI, W.; SU, Z.; HUANG, Q.; ZHANG, L.; CHEN, H.; ZHOU, R. Catecholamines promote *Actinobacillus pleuropneumoniae* growth by regulating iron metabolism. **Plos One**, v. 4, n. 10, p. 1-13. 2015.

MACLEAN, L. L., PERRY, M. B., VINOGRADOV, E. Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13. **Infection and Immunity**, n. 10, v. 72, p. 5925-5930. 2004.

MCKINLAY, J. B., LAIVENIEKS, M., SCHINDLER, B. D., MCKINLAY, A. A., SIDDARAMAPPA, S., CHALLACOMBE, J.F., LOWRY, S. R., CLUM, A., LAPIDUS, A. L., BURKHART, K. B., HARKINS, V., VIEILLE, C. A genomic perspective on the potential of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for industrial succinate production. **BioMed Central Genomics**, v. 11, n. 680, p. 1-16. 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed. 2010. 1160 p.

MARTINUSSEN, J.; SOLEM, C.; HOLM, A. K.; JENSEN, P. R. Engineering strategies aimed at control of acidification rate of lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 24, p. 124-129. 2013.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews Microbiology**, n. 3, p. 371-394. 1949.

MOORE, D. S.; FLIGNER, M. A. **A Estatística básica e sua prática**. 5ª ed. Rio de Janeiro. LTC. 555 p. 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. São Paulo: Artmed. 1300 p. 2014.

OTHAMAN, D. S.; SCHIRRA, H.; MCEWAN, A. G.; KAPPLER, U. Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolic and genomic analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5. 2014.

PEREIRA, M. F.; ROSSI, C. C.; QUEIROZ, M. V.; MARTINS, G. F.; ISAAC, C.; BOSSÉ, J. T.; LI, Y.; WREN, B. W.; TERRA, V. S.; CUCCUI, J.; LANGFORD, P. R.; BAZZOLLI, D. M. *S. Galleria mellonella* is an effective model to study *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Microbiology**, v. 161, p. 387 – 400. 2015.

PERRY, M. B. et al Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease**, n. 4, p. 299-308. 1990.

PERRY, M. B., MACLEAN, L. L., VINOGRADOV, E. Structural characterization of the antigenic capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-chain produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15. **Biochemical cell Biology**, n. 83, p. 61-69. 2004.

PERRY, M. B., MACLEAN, L. L. Structural characterization of the antigenic O-polysaccharide in the lipopolysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. **Carbohydrate Research**, n. 339, p. 1399-1402. 2004.

QIN, W. Trimeric autotransporter adhesins contribute to *Actinobacillus pleuropneumoniae* pathogenicity in mice and regulate bacterial gene expression during interactions between bacteria and porcine primary alveolar macrophages. **Antonie van Leeuwenhoek**, n.109, p. 51-70. 2016.

RAMJEET, M.; COX, A. D.; HANCOCK, M. A.; MOUREZ, M.; LABRIE, J.; GOTTSCHALK, M.; JACQUES, M. Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, galU, affects LPS

interaction with the RTX toxins ApxI and ApxII and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Molecular Microbiology**, v. 1, n. 70, p. 231-235. 2008.

ROSENDAL, S.; BOYD, D. A.; GILBRIDE, K. A. Comparative virulence of porcine Haemophilus bacteria. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, n. 49, p. 68–74. 1985

ROSSI, C. C.; VICENTE, A. M.; GUIMARÃES, W. V.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V.; BAZZOLLI, D. M. S. Face to face with *Actinobacillus pleuropneumoniae*: landscape of the distribution of clinical isolates in southeastern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 23, p. 2916-2924. 2013.

SHEEHAN, B. J.; BOSSÉ, J. T.; BEDDEK, A. J.; RYCROFT, A. N.; KROLL, J. S.; LANGFORD, P. R. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3960-3970. 2003.

SMITH, H.; TANG, C. M.; EXLEY, R. M. Effect of host lactate on Gonococci and Meningococci: new concepts on the role of metabolites in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4190-4198. 2007.

SONCINI, R. A.; PIFFER, I. A. Pleuropneumonia suína. III. Aspectos patológicos da doença. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18. Balneário Camboriú. Anais... Balneário Camboriú: **Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos**, 1982, p. 47.

SOUZA, K. K. **Aplicação da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) baseado no gene *cpx* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos experimentalmente e naturalmente infectados.** Dissertação. Curitiba. 2005.

SUBASHCHANDRABOSE, S.; LEVEQUE, R. M.; WAGNER, T. K.; KIRKWOOD, R. N.; KIUPEL, M.; MULKS, M. H. Branched-chain amino acids are required for the survival and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine. **Infection and Immunity**, n. 11, v. 77, p. 4925-4933. 2009.

SU, Z.; ZHU, J.; XU, Z.; XIAO, R.; ZHOU, R.; LI, L.; CHEN, H. A transcriptome map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* at single-nucleotide resolution using deep RNA-Seq. **Plos One**, n. 11, v. 3. 2016.

TONIATO, J. **Determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica em diferentes substratos**. Dissertação. 2013.

VAZ, C. S. L.; SILVA, S. C. Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 635-643. 2004.

WALES, M. R; FEWSON, C.A. NADP-dependent alcohol dehydrogenases in bacteria and yeast: purification and partial characterization of the enzymes from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 140, p. 173-183. 1994.

WANG, Z., YANG, ST. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource Technology**, n. 137, p. 116- 123. 2013.

WEIGEL, W. A.; DEMUTH, D. R. QseBC, a two-component bacterial adrenergic receptor and global regulator of virulence in *Enterobacteriaceae* and *Pasteurellaceae*. **Molecular Oral Microbiology**. 2015.

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

XU, Z.; ZHOU, Y.; LI, L.; ZHOU, R.; XIAO, S.; WAN, Y.; ZHANG, S.; WANG, K.; LI, L.; JIN, H.; KANG, M.; DALAI, B.; LI, T.; CHENG, Y.; ZHANG, L.; XU, T.; ZHENG, H.; PU, S.; WANG, B.; ZHANG, XL.; ZHU, GF.; WANG, S.; ZHAO.; CHEN, H. Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 Prevalent in China. **Plos One**, n. 3, v. 1, p. 1-12. 2008.

XU, Z.; CHEN, X.; LI, L.; LI, T.; WANG, S.; CHEN, H.; ZHOU, R. Comparative genome characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, n. 21, v. 192, p. 5625-5636. 2010.