

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

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.

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, anaeróbio 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.

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. É 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.

