

Cibele Zanardi Esteves

Aplicação de Nanopartículas de Sílica Mesoporosa na detecção de *Neisseria meningitidis* e o estudo de sua interação com DNA.

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CIBELE ZANARDI ESTEVES

**“Aplicação de nanopartículas de sílica mesoporosa na detecção de
Neisseria meningitidis e estudo de sua interação com DNA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pela candidata

Cibele Zanardi Esteves


e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestra
em Biociências e Tecnologia de Produtos
Bioativos na área de Fármacos, Medicamentos
e Insumos para Saúde

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Es85a Esteves, Cibele Zanardi, 1985-
Aplicação de nanopartículas de sílica mesoporosa na detecção de *Neisseria meningitidis* e estudo de sua interação com DNA / Cibele Zanardi Esteves. –
Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcelo Lancellotti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Biologia molecular. 2. *Neisseria meningitidis*. 3. Diagnóstico de laboratório. I.
Lancellotti, Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Application of mesoporous silica nanoparticles for the detection of *Neisseria meningitidis* and study its interaction with DNA

Palavras-chave em inglês:

Molecular biology

Neisseria meningitidis

Laboratory diagnosis

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Banca examinadora:

Marcelo Lancellotti [Orientador]

Rodrigo Ramos Catharino

Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Data de defesa: 17-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 17 de fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti



Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino



Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurelio Ramirez Vinolo



Assinatura

Dra. Thaís Franchini Tornatore

Assinatura

Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat

Assinatura

RESUMO

N. meningitidis, bactéria aeróbica Gram negativa, causa infecções meningocócicas que podem resultar em doenças severas incluindo meningite, sepsis e pneumonia. Uma vez que a administração precoce de antibióticos está relacionada às baixas taxas de morbidade e mortalidade, é de crucial importância iniciar o tratamento o mais rápido possível. A administração de antibióticos aos pacientes com suspeita de infecções meningocócicas antes da coleta de material biológico tem sido uma prática comum que pode prejudicar o diagnóstico microbiológico por cultura bacteriana. A abordagem nos últimos anos tem sido o desenvolvimento de técnicas alternativas que possam ser utilizadas para se obter o diagnóstico etiológico. Técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tem sido desenvolvidas para melhorar a sensibilidade e especificidade da detecção de microorganismo e aliadas a Nanotecnologia podem ser úteis para desenvolvimento de métodos alternativos de diagnóstico. Foi realizado o estudo entre a interação do DNA e nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-15 e SBA-16 através de retardação em gel e dicróismo circular. Depois foi padronizada PCR para *N. meningitidis* ATCC 23247 Sorogrupo B com a utilização de *primers* do gene *synD*, através de gradiente de $MgCl_2$. Também foi determinado o Limite de Detecção (LD) de DNA da PCR e então a reação foi adjuvada com nanopartículas de sílica mesoposa SAB-15 e SBA-16. Resultados de retardação em gel e dicróismo circular sugerem interação fraca entre DNA e estas nanopartículas e a alteração desta interação quando foram submetidos a PCR. A concentração de $MgCl_2$ determinada foi de 1,25mM e o LD de DNA foi de 3,13 $\mu g/\mu L$, e a utilização de MSN em reações de PCR Convencional para a detecção de *N. meningitidis* não demonstrou aumento da sensibilidade da técnica.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis, Gram-negative aerobic bacteria, which cause meningococcal disease can result in severe diseases including meningococcal meningitis, sepsis and death. Since the early administration of antibiotics is related to lower rates of morbidity and mortality, it is crucial to start treatment as soon as possible. The administration of antibiotics to patients with suspected meningococcal disease before the collection of biological material has been a common practice that can harm the microbiological diagnosis of bacterial culture. The approach in recent years has been the development of alternative techniques that might be used to obtain the etiologic diagnosis. Molecular biology techniques such as the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been developed to improve the sensitivity and specificity of detection of a microorganism and allied Nanotechnology may be useful for development of alternative methods of diagnosis. Study the interaction between DNA and SBA-15 and SBA-16 was performed by gel retardation and circular dichroism. After PCR was standardized for *N. meningitidis* Serogroup B ATCC 23247 by using primers Synd gene through MgCl₂ gradient. It was also determined the Limit of Detection (LOD) DNA PCR and then the reaction was adjuvated with silica nanoparticles mesoposa SAB-15 and SBA-16. Results of gel retardation and circular dichroism suggest weak interaction between DNA and these nanoparticles and the change of this interaction when they were subjected to PCR. The MgCl₂ concentration determined was 1.25 mM and the DNA was LD 3.13 µg / µL, MSN and use in standard PCR reactions for the detection of *N. meningitidis* showed no increased sensitivity of the technique.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	xi
DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Meningite	4
1.1.2. <i>Neisseria meningitidis</i>	5
1.1.3. Diagnóstico Laboratorial.....	8
1.2. Biologia Molecular	9
1.2.1. Reações de PCR.....	9
1.2.2. Aplicações da Biologia Molecular em Diagnóstico de <i>Neisseria meningitidis</i>	10
1.3. Nanotecnologia e Nanodiagnóstico.....	11
1.3.1. Nanopartículas de Sílica.....	12
1.3.1.1. Nanopartículas de sílica mesoporosa do tipo <i>Santa Barbara</i>	14
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Nanopartículas de Sílica Mesoporosa SBA-15 e SBA-16	23
3.2. Análises de interação entre DNA e MSN.....	26
3.2.1. Afinidade entre DNA genômico e MSN SBA-15 e SBA-16 por retardação em Gel.....	26
3.2.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular	26
3.3. Técnicas de biologia molecular	30
3.3.1. Extração e quantificação de DNA genômico.....	30
3.3.2. Reações de Polimerização em Cadeia da Taq Polimerase – PCR Convecional	31
3.3.2.1. Parâmetros gerais da reação	31
3.3.2.2. Gradiente de MgCl ₂	33
3.3.2.3. Limite de Detecção de DNA da PCR	33
3.3.2.4. Gradiente de MSN SBA-15 e SBA-16.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Afinidade entre DNA genômico e MSN SBA-15 e SBA-16 por retardamento em gel	37
4.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular	39
4.3. Padronização da reação de PCR.....	42
4.3.1. Gradiente de Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	42
4.3.2. Limite de detecção de DNA da PCR	44
4.4. Gradiente de MSN SBA-15 e SBA-16	45
5. CONCLUSÃO.....	51
6. BIBLIOGRAFIA.....	55

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Décio e Marlene e à minha irmã Cynthia,
por todo o carinho e confiança depositados em mim,
pelos esforços dedicados à minha educação,
por sempre me estimularem a lutar pelos meus sonhos
por me apoiarem a seguir carreira acadêmica,
e, principalmente, por estarem tão perto mesmo estando tão longe.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Lancellotti** pela amizade desde o período da graduação, antes mesmo de você ser professor! Por ter me acolhido em seu laboratório e ter me orientado neste trabalho. Por ter feito parte do meu amadurecimento pessoal e acadêmico. A orientação de Mestrado acaba aqui, mas a amizade continua e a parceria na pesquisa também!

À **Doutora Luciana Maria de Hollanda** por todas as conversas em momentos difíceis, pelos conselhos e discussões sobre a pesquisa desenvolvida.

À **Doutora Daisy Machado** por ser tão solícita e preocupada, e por ter-me ajudado na etapa final deste trabalho. Daisy, sem você parte disso não teria acontecido!

A minha amiga Mestra **Maria Cecília K. Amstalden**, pela amizade mais improvável do mundo! Pelo companheirismo, por sempre ter coragem de me falar aquilo que eu não queria ouvir, por enxugar minhas lágrimas e por sempre me fazer levantar e seguir em frente! Nunca esquecerei o ano de 2013 ao seu lado!

Ao meu querido amigo, e também colega de laboratório, **Mestre Danilo Antonini**, por todo carinho e parceria, por sempre ter um tempo para me escutar, pelas broncas e brigas!

À minha amiga, e também colega de laboratório, **Mestra Rafaella Fabiana Carneiro Pereira**, pela amizade e por ter-me ensinado que biologia molecular não é apenas PCR! Grande parte do que aprendi neste Mestrado devo a você! E isso levarei comigo a vida toda!

À minha amiga e companheira de laboratório **Mestre Thais Holtz Theizen**, por todas as discussões e conselhos. Por sempre me estimular a enxergar quem nem tudo está perdido!

Ao Mestre **Lucas Petersen Barbosa Lima**, por sempre me incentivar a desenvolver esta dissertação de Mestrado e a seguir a carreira acadêmica.

Ao amigo e companheiro de experimentos **Mestre Fernando Bergamini**, pelas conversas e conselhos. E, juntamente com **Doutora Camila e Prof. Dr. Corbi**, por toda a orientação e execução de experimentos na parte química deste trabalho.

Ao meu amigo **Mestre Diogo Oliveira**, ex companheiro chato de graduação, por sempre me dizer que tudo irá ficar bem, mesmo quando tudo está dando errado! E que venham mais quatro anos de parceria!

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino**, que desde a graduação acompanha meu desenvolvimento acadêmico, por sempre acreditar no meu potencial, pelas conversas, conselhos e orientações. Por me estimular a lutar pelas coisas que acredito. Só alegria com você sempre! E que venha o doutorado!

Obrigada!

Cibele Zanardi Esteves

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema ilustrativo dos componentes da membrana externa de *N. meningitidis* capsulada (adaptado de Tzeng, Stephens 2000)..... 6
- Figura 2:** Esquema que demonstra a interação entre os grupos silanol presentes na superfície de nanopartículas de sílica com os grupos fosfatos do DNA..... 13
- Figura 3:** Imagens de Nanopartículas de Sílica Mesoporosa adquiridas através de microscopia eletrônica de varredura (A) e microscopia eletrônica de transmissão (B) (adaptado de Nandiyanto et al. 2009). 15
- Figura 4:** (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de SBA-15 evidenciando a presença de alongados de partículas vermiculares de 590 μm . Microscopia eletrônica de transmissão mostra um arranjo bem definido de poros hexagonais quando o (b) feixe de elétrons incide de forma paralela ao eixo principal do mesoporo e (c) canais unidirecionais quando o feixe de elétrons incide de forma perpendicular, evidenciando poros 2D (adaptado de Hollanda et al. 2011). 24
- Figura 5:** (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de SBA-16 exhibe agregados de partículas de forma circular, com diâmetro de 15 a 20 μm . Microscopia eletrônica de transmissão mostra um arranjo bem definido de poros cúbicos 3 D quando (b) vistos ao longo do eixo do poro e (c) perpendicular ao eixo do poro (adaptado de Hollanda et al. 2011). 25
- Figura 6:** Conformações das duplas fitas de DNA: A-DNA, B-DNA e Z-DNA..... 27
- Figura 7:** Espectro de Dicroísmo Circular característicos para as conformações das duplas fitas de DNA nas formas B-DNA, Z-DNA e A-DNA..... 28
- Figura 8:** Esquema do gene *synD* feito no programa *pDRAW*[®] com as regiões de anelamento dos primers *synD* e *tbp2*. A sequência do gene foi obtida do Genbank –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – *N. meningitidis* linhagem M04-240196. Sequência de referência no NCBI: NC.017515.1. 32
- Figura 9:** Gel de afinidade entre DNA e MSN SBA-15 e 16 em meio aquoso. C=Controle DNA, 15 = MSN SBA15, 16 = MSN SBA-16. Números de 1 a 4 correspondem, respectivamente às proporções DNA/MSN em ng/ng: 2/0,6, 2/1,2, 2/2,4 e 2/5..... 37

Figura 10: Gel de afinidade entre DNA e MSN SBA-15 em Solução Tampão e $MgCl_2$. Números de 1 a 7 correspondem, respectivamente às proporções DNA/MSN em ng/ng: 500/250, 500/500, 500/1.000, 500/2.500, 500/5.000, 500/25.000, 500/50.000 antes das PCR e os números 1P a 7P correspondem à mesma proporção de DNA e MSN SBA-15 após PCR. As bandas 8 e 8P corresponde à MSN SBA-15 pura.	38
Figure 11: Gel de afinidade entre DNA e MSN SBA-15 em Solução Tampão e $MgCl_2$. Números de 1 a 7 correspondem, respectivamente às proporções DNA/MSN em ng/ng: em: 500/250, 500/500, 500/1.000, 500/2.500, 500/5.000, 500/25.000, 500/50.000 antes das PCR e os números 1P a 7P correspondem à mesma proporção de DNA e MSN SBA-15 após PCR. As bandas 8 e 8P corresponde à MSN SBA-15 pura.	39
Figura 12: Espectro DC de DNA antes (DNA C) e após (DNA P) a PCR.....	40
Figura 13: Espectro de DC de interação entre DNA-SBA-15 e DNA-SBA-16 antes da PCR.....	41
Figura 14: Espectro de DC de interação entre DNA-SBA-15 e DNA-SBA-16 antes da PCR.....	41
Figura 15: Gradiente de Cloreto de Magnésio. As bandas de 1 a 8 correspondem às concentrações de $MgCl_2$ (em mM): 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75 e 2.	43
Figura 16: Gradiente de DNA. As bandas de 1 a 8 correspondem às seguintes concentrações de DNA em $\eta g/\mu L$ de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78.....	44
Figura 17: Gradiente de DNA. As bandas de 1 a 9 correspondem, respectivamente, às seguintes concentrações de DNA em $pg/\mu L$ de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 e 0,39.45	
Figura 18: Gradiente de MSN SBA-15 na PCR. A Banda 1 corresponde ao Branco da reação. As Bandas 2 a 4 correspondem a PCR sem MSN (banda-concentrações em $pg/\mu L$: 2-6,25, 3-3,13 e 4-1,56). As bandas 5 a 7 correspondem às mesmas concentrações de DNA anteriores adjuvadas com 6,25 $pg/\mu L$ de MSN SBA-15, bandas 8 a 10 com 12,5 $pg/\mu L$, bandas 11 a 13 com 25 $pg/\mu L$ e 14 a 16 com 50 $pg/\mu L$, respectivamente.....	47
Figura 19: Gradiente de MSN SBA-16 na PCR. A Banda 1 corresponde ao Branco da reação. As Bandas 2 a 4 correspondem a PCR sem MSN (banda-concentrações em $pg/\mu L$: 2-6,25, 3-3,13 e 4-1,56). As bandas 5 a 7 correspondem às mesmas concentrações de DNA anteriores adjuvadas com 6,25 $pg/\mu L$ de SBA-16, bandas 8 a 10 com 12,5 $pg/\mu L$, bandas 11 a 13 com 25 $pg/\mu L$ e 14 a 16 com 50 $pg/\mu L$, respectivamente.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades dos mesoporos de SBA-15 e SBA-16 obtidos pela medida de adsorção de nitrogênio. A = área superficial específica, D = diâmetro de poro e V= volume de poros (adaptado de Holanda et al 2011).	25
Tabela 2: Sequência de primers utilizados em PCR convencional (syn D e tbp2 e tamanho do fragmento amplificado.	31

LISTA DE ABREVIACOES

µg: Micrograma

ng: Nanograma

nm: Nanometros

pg: Picograma

µL: Microlitro

ATCC: American Type Culture Collection

CTAB: Brometo de cetiltrimetilamnio

DC: Dicroísmo Circular

DM: Doença Meningocócica

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: cido desoxirribonucléico

g: Gramas

LCR: Líquido Cefaloraquidiano

LD: Limite de detecção

mg: Miligrama

mL: Mililitro

MLST: Tipagem de Sequências de Multilocos

mM: Milimolar

MSN: Nanopartículas de sílica mesoporosa

NPSi: Nanopartículas de sílica

pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia da Polimerase

RT-PCR: Reação em cadeia da Polimerase em tempo real.

RPM: Rotação por minuto

SBA-15: Santa Barbara 15

SBA-16: Santa Barbara 16

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

TE: Tris - EDTA

UV: Ultravioleta

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis é uma bactéria que desenvolve infecções que levam ao desenvolvimento da Doença Meningocócica (DM). A DM pode se manifestar em três estados clínicos: meningite, sepse e pneumonia (Kim, Blaise 2012, Ministério da Saúde 2009, Taha 2000, WHO 2010). O início dos sintomas é súbito e morte pode se seguir em poucas horas. De 10 a 15% dos pacientes há defeitos neurológicos persistentes, incluindo perda de audição, distúrbios de fala, perda dos movimentos dos membros, retardo mental e paralisia. A DM ocorre esporadicamente em todo o mundo, com variações sazonais e responde por uma proporção de meningite bacteriana endêmica. (WHO 2010).

Os principais alvos do diagnóstico molecular da *N. meningitidis* são os genes responsáveis pela síntese de polissacarídeos de cápsula juntamente com os genes constitutivos, ou seja, aqueles indispensáveis ao metabolismo normal das bactérias (Harrison et al. 2011, Vogel 2010, Zhu et al. 2012, Whang et al. 2012).

Além disto, o foco nos últimos anos tem sido desenvolver métodos diagnósticos alternativos que sejam mais sensíveis, rápidos, menos custosos e que possam ser aplicados em situações de campo no caso de epidemias (Boving et al. 2009, Carbonelle et al. 2011, Harrison et al. 2011, Zhu et al. 2012), uma vez que é DM é uma doença que se desenvolve de forma muito rápida e o diagnóstico preciso nem sempre é tão rápido quanto seria necessário. Assim a presença de técnicas de PCR no diagnóstico é de extrema importância uma vez que elas são rápidas e apresentam resultados conclusivos.

Portanto a presente dissertação refere-se a uma possível utilização de nanopartículas de sílica no diagnóstico da DM. Neste primeiro instante um estudo da melhor eficiência da utilização das técnicas de PCR na associação da nanopartículas SBA 15 e SBA

16 com a bactéria *N. meningitidis* foi avaliado, para posteriores estudos das mesmas nanopartículas com o material biológico.

1.1. Meningite

O termo meningite expressa a ocorrência de um processo inflamatório das meninges, membranas que envolvem o cérebro e a medula espinhal (Kim, Blaise 2012, Ministério da Saúde 2009, WHO 2010). Pode causar dano cerebral grave e é fatal em 50% dos casos se não for tratada (WHO 2010). É frequentemente causada por infecções bacterianas, virais ou fúngicas, mas também pode ser desencadeada por hemorragia subaracnóidica, processos inflamatórios, medicamentos e neoplasias (Boving et al. 2009, Ministério da Saúde 2009, WHO 2010).

As meningites de origem bacteriana e viral são as mais importantes pela sua magnitude e capacidade de ocasionar surtos da doença, sendo os principais causadores: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* e alguns enterovírus, dentre eles Poliovírus, Echovírus e Coxsackievírus (Ministério da Saúde 2009, Taha 2000).

A transmissão das meningites infecciosas ocorre de pessoa a pessoa, através das vias respiratórias, por gotículas de secreções da nasofaringe havendo necessidade de contato íntimo ou direto com as secreções respiratórias da pessoa portadora do agente infeccioso. A transmissão fecal-oral é de grande importância quando se diz respeito a meningites causadas por enterovírus (Ministério da Saúde 2009, WHO 2010). O período de incubação é em média de 4 dias, mas pode variar entre dois a dez dias (WHO 2010).

O quadro clínico da meningite é grave e caracterizado por febre, cefaleia intensa, náusea, vômito, rigidez da nuca, prostração e confusão mental, sinais de irritação meníngea e alteração do líquido cefalorraquidiano (LCR) (Ministério da Saúde 2009, Taha 2000). A presença de alguns sinais clínicos pode sugerir a suspeita etiológica. No caso de *N. meningitidis* pode surgir exantema (*rash*) principalmente nas extremidades do corpo. Diferentemente das demais meningites, as meningites tuberculosa e fúngica podem apresentar evolução mais lenta, de semanas ou meses, dificultando o diagnóstico por suspeição. No caso das meningites virais, o quadro clínico é semelhante aos das demais meningites agudas, mas o que chama atenção é o bom estado geral do paciente associado à presença de sinais de irritação meníngea. Quando se trata de enterovírus é importante destacar que os sinais e sintomas inespecíficos que mais antecedem e/ou acompanham o quadro de meningite são: manifestações gastrointestinais (vômito, anorexia e diarreia), respiratórias (tosse, faringite) e ainda mialgia e erupções cutâneas (Ministério da Saúde 2009).

Mesmo quando a doença é diagnosticada precocemente e o tratamento é adequado, 5 a 10% dos pacientes morrem, tipicamente 24h a 48h após o início dos sintomas. Também pode causar danos ao cérebro, perda de audição ou dificuldade de aprendizagem em 10 a 20% dos pacientes que sobrevivem (WHO 2010).

1.1.2. Neisseria meningitidis

N. meningitidis é uma bactéria capsulada Gram-negativa considerada um membro comensal da nasofaringe humana. Esta coloniza apenas humanos, sendo que não há reservatório animal desta bactéria. Estima-se que 5% a 10% da população seja portadora

assintomática (Tzeng, Stephens 2000, WHO 2010).

Esta bactéria é tradicionalmente classificada de acordo com as diferença estruturais dos polissacarídeos presentes na cápsula, em 12 diferentes sorogrupos: A, B, C, 29E, H, K, I, L, X, Y, W135 e Z. Entretanto, os envolvidos em casos epidêmicos são os sorogrupos A, B, C, Y e W135 (Girard et al. 2006, Ministério da Saúde 2009, Zhu et al. 2012, WHO 2010).

Na Figura 1 pode-se visualizar a estrutura da cápsula de *N. meningitidis*. A membrana externa contém pilli e outras proteínas, pequenas cadeias de lipopoli(oligo) sacarídeos, fosfolipídios e polissacarídeos de cápsula, sendo estes últimos são os principais contribuintes para a virulência de *N. meningitidis* (Tzeng, Sthephens 2000).

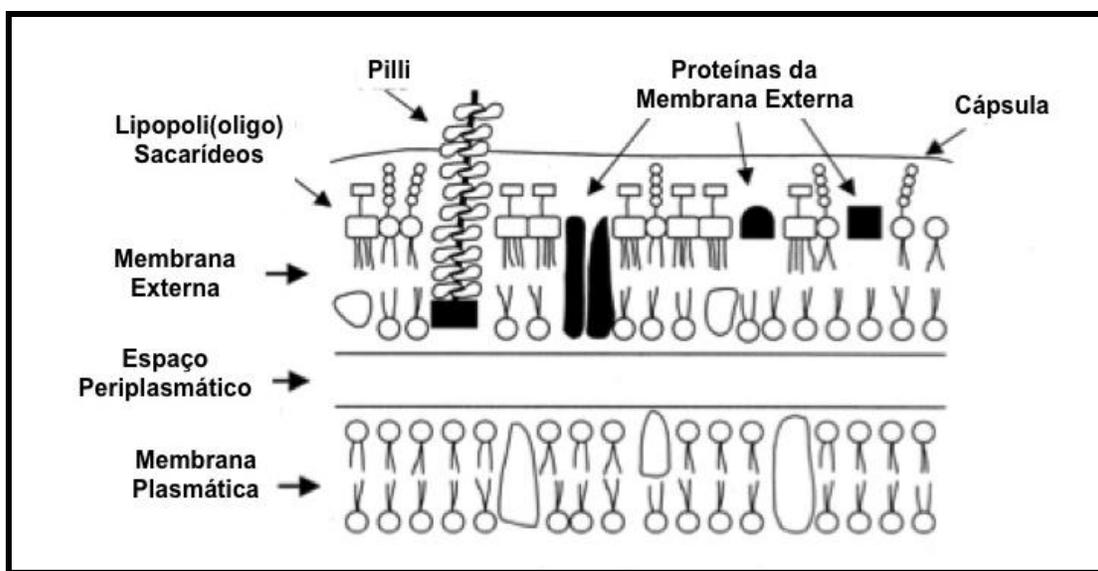


Figura 1: Esquema ilustrativo dos componentes da membrana externa de *N. meningitidis* capsulada (adaptado de Tzeng, Stephens 2000).

Os polissacarídeos de cápsula possuem importante papel em propriedades antifagocitárias e antibacterianas desta bactéria durante a invasão da corrente sanguínea ou LCR. Também fornecem propriedades protetoras e antiaderentes as quais promovem a

transmissão, propagação e sobrevivência da bactéria dentro e fora de compartimentos intracelulares (Tzeng, Stephens 2000)

Tais polissacarídeos são sintetizados pelo operon *syn* sendo compostos por derivados do ácido siálico ou ácido N-acetil-neuramínico que podem se apresentar como homopolímeros (no caso dos sorogrupos B e C, compostos pelo ácido α -2,8 e α -2,9 N-acetil-neuramínico, respectivamente) ou heteropolímeros (como no caso dos sorogrupos Y e W135, compostos por 6-D-glicose e 6-D-galactose ligados ao ácido α -1,4-N-acetil-neuramínico, respectivamente). Já o sorogrupo A, frequentemente isolado em países do cinturão africano, tem seu polissacarídeo capsular composto por α -1,6-N-acetil-manosamina-1-fosfato e o operon *syn* possui seu homólogo conhecido como operon *myn*, o qual é composto pelos genes *mynA-C*, implicados na síntese capsular dos meningococos pertencentes a estes sorogrupo (Tzeng, Stephens 2000).

O fenômeno relacionado com a variação capsular desta bactéria, em que há uma transferência de material genético entre dois clones, é conhecido como *switch* capsular. Tal processo, promove a alteração de um sorogrupo a outro através da transmissão horizontal de material genético, transformando por exemplo linhagens do tipo C em linhagens do tipo B, ou linhagens do tipo C em linhagens do tipo W135 (Taha 2000, Tzeng, Stephens 2000).

Os genes responsáveis pela síntese de polissacarídeos de cápsula são um dos principais alvos do diagnóstico molecular destas bactérias juntamente com os genes constitutivos, ou seja, aqueles indispensáveis ao metabolismo normal das bactérias (Harrison et al. 2011, Vogel 2010, Zhu et al. 2012, Whang et al. 2012), assim verifica-se a necessidade de estudar mais este ramo para o mais rápido e eficiente diagnóstico da doença.

1.1.3. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado através da cultura de materiais biológico do paciente. Quando suspeita-se de meningite o material escolhido é o LCR, mas quando há outras manifestações da DM como pneumonia e sepse são analisados escarro e sangue, respectivamente (Ministério da Saúde 2009, WHO 2010).

Após o isolamento da bactéria do material biológico são realizados testes simples como Gram, oxidase e catalase e outros testes fenotípicos que completam a identificação do microrganismo (Carbonelle et al. 2011, Kotilainen et al. 1998). Os testes fenotípicos podem ser realizados através de kits comerciais, métodos automatizados, ou mesmo série bioquímica manual e, em geral, consomem de 18 a 30 horas e, em alguns casos, podem ser imprecisos na identificação de espécies (Carbonelle et al. 2011). Nesta fase também poderá se determinar o sorogrupo de *N. meningitidis* através de testes de aglutinação com anticorpos (Girard et al. 2006, Zhu et al. 2012). Paralelamente são realizados testes de susceptibilidade a antimicrobianos tanto manuais como automatizados, que, além de ajudar na identificação do microrganismo, proporcionam alternativas ao tratamento do paciente que, neste momento, já estará recebendo antibióticos de amplo espectro e, em casos de epidemias, podem sugerir alternativas para a contenção da doença (Carbonelle et al. 2011, Ministério da Saúde 2009).

A administração de antibióticos em pacientes com suspeita de meningite no momento da admissão no hospital e a posterior coleta de materiais biológicos é uma prática comum e pode alterar significativamente a detecção destes microrganismos por cultura do material biológico, já que pode ter ação bactericida ou bacteriostática, dificultando o crescimento do microrganismo em meio de cultura apropriado. Além disso, como a meningite pode ser

causada por baixa carga microbiana, muitas vezes o microrganismo não consegue ser recuperado pela cultura do material biológico (Boving et al. 2009, Kotilainen et al. 1998, Taha 2000).

Desta forma, o foco nos últimos anos tem sido desenvolver métodos diagnósticos alternativos que sejam mais sensíveis, rápidos, menos custosos e que possam ser aplicados em situações de campo no caso de epidemias (Boving et al. 2009, Carbonelle et al. 2011, Harrison et al. 2011, Zhu et al. 2012).

1.2. Biologia Molecular

1.2.1. Reações de PCR

A Biologia Molecular é, na atualidade, uma ferramenta muito utilizada para caracterizar bactérias quanto a Gênero e Espécie (Griffiths et al. 2005, Passarge et al. 2007).

A técnica mais empregada é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*). Após extrair o DNA da bactéria de interesse, podem-se produzir várias cópias de pedaços específicos deste DNA utilizando *primers*. Estes são sequências conhecidas de DNA características de Gêneros ou de Espécies de bactérias (Griffiths et al. 2005, Passarge et al. 2007).

Quando se utiliza a PCR convencional, a síntese de DNA é realizada em termociclador e as cópias produzidas poderão ser visualizadas após a realização de uma eletroforese. Se a bactéria estudada tiver pedaços de DNA homólogos ao *primer*, as cópias de DNA produzidas pela reação de PCR irão correr pelo gel e formar uma banda correspondente ao tamanho do *primer* (Carvalho et al. 2010, Griffiths et al. 2005, Passarge et al. 2007).

1.2.2. Aplicações da Biologia Molecular em Diagnóstico de *Neisseria meningitidis*.

As técnicas de PCR são muito utilizadas no diagnóstico das doenças causadas por *N. meningitidis*, tanto a partir de extração de DNA dos microrganismos isolados do material biológico (Boving et al. 2009, Zhu et al. 2012, Whang et al. 2012), tanto como de DNA extraído diretamente de material biológico (Kotilainen et al. 1998, Taha 2000).

O padrão ouro para a identificação molecular de bactérias é o MLST (*Multilocus Sequence Typing*) que identifica 7 genes constitutivos, ou seja, genes necessários para a manutenção da função celular básica em condições fisiológicas normais. No caso de *N. meningitidis* estes genes são: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* e *pgm*. Estes genes codificam enzimas responsáveis pelo funcionamento bioquímico normal de *N. meningitidis* que são, respectivamente: proteína transportadora ABC, adenilato ciclase, chiquimato desidrogenase, fumarato hidratase, glicose-6-fosfato desidrogenase, subunidade de piruvato desidrogenase e fosfoglicomutase. As sequências de *primers* e genes podem ser depositadas e consultadas abertamente através do PubMLST (<http://pubmlst.org/neisseria/>) (Harrison et al. 2011, Vogel 2010).

Outros genes específicos da formação de cápsula também podem ser utilizados para a determinação de cada sorogrupo de *N. meningitidis*. Sorogrupo A: *sacB* ; Sorogrupo W135: *synG*; Sorogrupo X: *xcbB*; Sorogrupo B: *syn D*; Sorogrupo C: *syn E*; Sorogrupo Y: *syn F* (Wang et al. 2012, Zhu et al. 2013)

As técnicas de biologia molecular modernas, como a *Real Time* PCR (RT-PCR), revolucionaram o diagnóstico de doenças infecciosas, aumentando a sensibilidade e reduzindo o tempo gasto em laboratório. Porém, assim como as técnicas de diagnóstico

laboratorial convencional, podem ser menos sensíveis em alguns casos, exigem pessoal qualificado e são de alto custo o que é inadequado ou inviável em situações de campo ou mesmo em países em desenvolvimento. Portanto existe uma necessidade de estratégias alternativas para a detecção e identificação microbianas (Azzazy et al. 2006, Carbonelle et al. 2011, Iliina et al. 2009, Syed et al. 2013).

1.3. Nanotecnologia e Nanodiagnóstico

A Nanotecnologia pode ser definida como a utilização de materiais, dispositivos ou sistemas em nanômetros (nm), ou seja, um bilionésimo de metro de escala. Nanomateriais como nanopartículas e nanotubos são a principal aplicação da nanotecnologia na área da biologia e medicina. Podem ser classificados de acordo com o material que são feitos em nanomateriais metálicos, semicondutores e poliméricos, sendo que as nanopartículas de ouro, magnéticas, fluorescentes e poliméricas são as que possuem maior aplicação no diagnóstico de patógenos e doenças (Kaittanis et al. 2009, Liu et al. 2011, Syed 2013).

A alta superfície em relação ao volume dos nanomateriais aumenta consideravelmente a interação entre biomoléculas por biosensores ópticos, elétricos e eletroquímicos. Sistemas que pode ser automatizados e miniaturizados conferem uma enorme vantagem sobre os outros, uma vez que podem ser usados em situações de campo que requer protocolos menos complicados, além de aumentar a sensibilidade e o limite de detecção de eventos biológicos (Liu et al. 2011, Syed 2013).

Nanopartículas metálicas de ouro e prata possuem propriedades ópticas e eletrônicas devido ao seu tamanho e composição. Quando acoplados a ligantes de afinidade, como por exemplo, oligonucleotídeos específicos, estes nanomateriais podem ser utilizados como

sensores de fitas de DNA complementares, detectáveis por mudança de cor. Outras nanopartículas incluindo pontos quânticos fluorescentes e nanotubos de carbono têm sido utilizados em várias aplicações, incluindo detecção de DNA e o desenvolvimento de imunoenaios para a detecção de bactérias e toxinas (Kaittanis et al. 2009, Syed 2013).

O nanodiagnóstico é a utilização da nanotecnologia para fins de diagnóstico clínico. Esta nova linha de estudo foi desenvolvida para atender a demanda do diagnóstico clínico precoce e ser mais sensível aos diferentes tipos de doenças, através de métodos mais sensíveis, robustos e reprodutíveis, tornando-os adequados e aplicáveis em locais com poucos recursos, como áreas rurais de países em desenvolvimento, em situações de campo, como em epidemias (Azzazay et al. 2006, Shinde et al. 2012, Syed 2013).

As propriedades dos nanomateriais utilizados para a detecção de agentes patogênicos podem ser adaptadas ao alterar o tamanho, forma, composição e modificação de sua superfície. Particularmente sua eletrônica, espectroscopia (emissiva e absorvente), dispersão de luz e propriedades condutoras podem ser alteradas através de mudanças nos parâmetros estruturais das nanopartículas, incluindo dimensão, composição, disposição de sua estrutura e propriedades de ligação. Nos últimos anos, a funcionalização, ou seja, o recobrimento dos nanomateriais com ligantes específicos para os alvos diagnóstico, têm revolucionado a detecção de patógenos, sendo possível o desenvolvimento de nanomateriais cada vez mais específicos para cada alvo (Kaittanis et al. 2009).

1.3.1. Nanopartículas de Sílica

As nanopartículas de sílica (NPSi) quando comparada com nanopartículas de outros materiais apresentam papel dominante devido às suas características fundamentais, tais

como, tamanho (em geral de 5 a 1000 ηm), propriedades ópticas únicas, alta área superficial específica, baixa densidade, capacidade de adsorção, capacidade para encapsulação, biocompatibilidade e baixa toxicidade. As principais aplicações das NPSi na área médica são adsorção de proteínas e sua separação, detecção e purificação de ácidos nucleicos, entrega de fármacos e genes e imageamento (Biju 2014, Bitar et al. 2012).

Dentre as propriedades nas NPSis, a que chama atenção para o uso em nanodiagnóstico é a interação de sua superfície com os grupos fosfatos presentes em DNA. Na figura 2 podemos observar um esquema desta interação entre grupos fosfatos de DNA e grupos silanol presentes na superfície das NPSi.

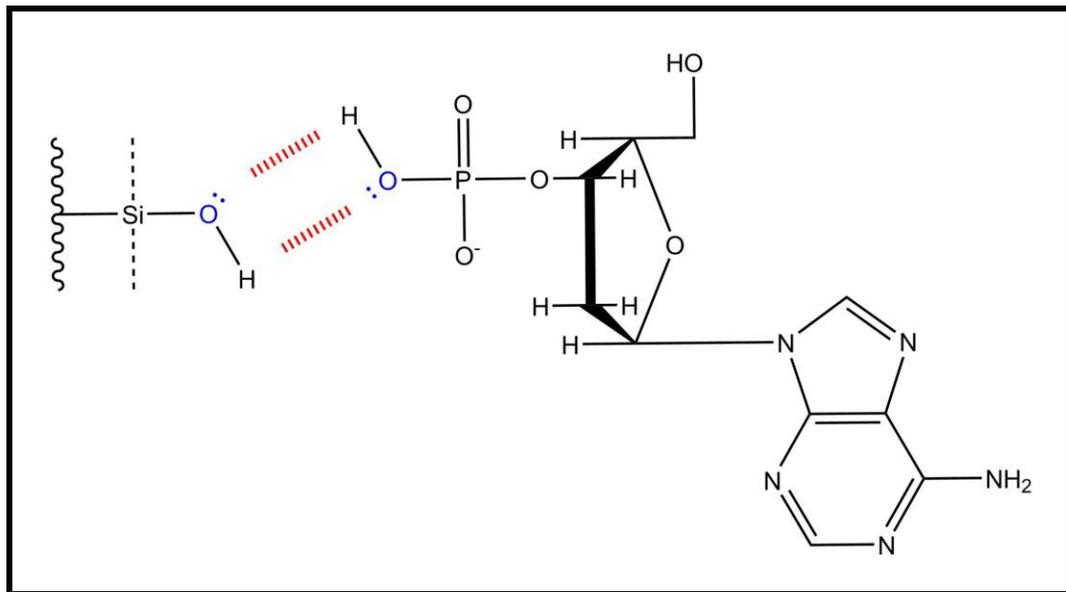


Figura 2: Esquema que demonstra a interação entre os grupos silanol presentes na superfície de nanopartículas de sílica com os grupos fosfatos do DNA.

A interação entre grupos silanol de NPSi com resíduos de fosfato do DNA pode ser controlada por três efeitos: forças de repulsão eletrostática fracas, desidratação as

superfícies do DNA e da sílica e, principalmente, formação de ligações de hidrogênio na camada de contato entre sílica e DNA (Bitar et al. 2012, Melzak et al. 1996).

Através da compreensão da natureza destas interações puderam ser desenvolvidas superfícies de sílica para interações mais específicas, voltadas para proteção do DNA de enzimas DNAses; eletrodos de sílica-ouro e sílica-platina para melhorar o limite de detecção de DNA; desenvolvimentos de sílica recoberta com compostos magnéticos para extração e DNA (Bitar et al. 2012).

1.3.1.1. Nanopartículas de sílica mesoporosa do tipo *Santa Barbara*

As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSN – *Mesoporous Silica Nanoparticles*) foram descobertas nos anos de 1990 e sua síntese normalmente se dá pela reação de polimerização *Sol-Gel* ou pectização: ocorrem reação de hidrólises e condensações do precursor que permite a formação de partículas de tamanho coloidal (*Sol*) e posterior formação de rede tridimensional (*Gel*) (Kwon et al. 2013, Chen et al. 2013)

O termo *mesoporoso* se refere ao tamanho de poro de 2 a 50 nm que pode ser ajustado de acordo com a utilização a qual se destina a nanopartícula. A estrutura interna dos poros é considerada a propriedade mais fascinante da MSN. Os mesoporos são distribuídos de forma alinhada e estruturada apresentando estruturas de favo de mel, com centenas de canais vazios. Estas propriedades dos mesoporos são muito utilizados para a entrega de fármacos e outras moléculas. A estrutura interna dos MSN, incluindo tamanho, volume e estrutura alinhada dos mesoporos, pode ser controlada por reagentes utilizados durante sua síntese (Kwon et al. 2013).

Pode-se visualizar na Figura 2 as imagens A e B de uma MSN adquiridas por de

microscopia eletrônica de varredura e por microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente. O diâmetro médios destas nanopartículas é de 41nm. Na imagem B consegue-se visualizar de forma mais clara a presença dos mesoporos organizados que, nesta MSN, possui cerca de 6nm (Nandiyanto et al. 2009).

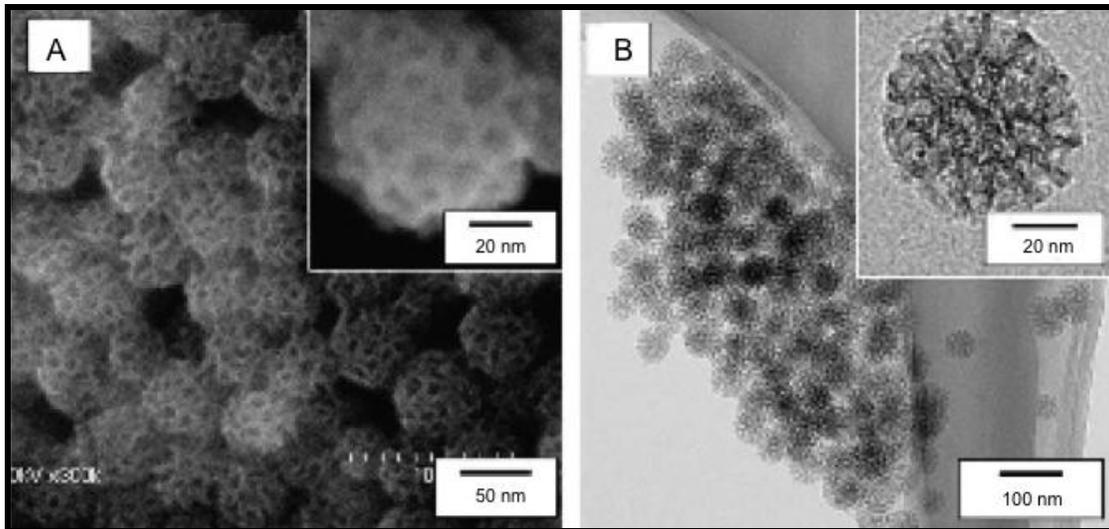


Figura 3:Imagens de Nanopartículas de Sílica Mesoporosa adquiridas através de microscopia eletrônica de varredura (A) e microscopia eletrônica de transmissão (B) (adaptado de Nandiyanto et al. 2009).

Os grupos silanol presentes na superfície das MSN permitem com que estas sejam facilmente funcionalizadas com uma vasta gama de grupos funcionais orgânicos. Os grupos funcionais de superfície podem desempenhar vários papéis em aplicações biomédicas de MSN de: (a) controle de carga de superfície de MSN, (b) ligação química com moléculas funcionais dentro e fora dos poros, (c) controlar o tamanho do poro de entrada para aprisionar moléculas nos mesoporos. Devido à forte ligação Si-O, MSN são mais estáveis a estímulos externos, tais como *stress* mecânico e de degradação em comparação com outras partículas orgânicas e inorgânicas, eliminando a necessidade de estabilização adicional, tais como ligantes covalentes utilizados em outros sistemas de entrega (Kwon et al. 2013).

Existem vários tipos de MSN, dentre elas *Santa Barbara* 15 e 16 (SBA 15 e 16) (Chen et al. 2013, Stevens et al. 2006, Kwon et al. 2013).

SBA-16 é um material com arranjo cúbico de poros 3D. Cada mesoporo nesta estrutura cúbica é conectado com oito vizinhos próximos. Já SBA-15 possui mesoporos hexagonais 2D com quantidade apreciável de microporos e mesoporos pequenos ligando os mesoporos maiores do material. O formato externo das nanopartículas SBA também pode ser variado. A SBA-15 já foi sintetizada em forma de corda, circular, torre e giróide, enquanto a SBA-16 já foi sintetizada em forma de dodecaedro e giróide (Hollanda et al. 2011, Stevens et al. 2006). O controle sobre a morfologia dos materiais SBA pode ser obtido por variações dos parâmetros de síntese ou através da utilização de co-solventes, co-surfactantes ou vários sais (Stevens et al. 2006).

Dentre as aplicações destas MSN SBA-15 e SBA-16 pode-se destacar transformação em *N. meningitidis* (Hollanda et al. 2011) e encapsulação de enzimas e proteínas para aplicação em biocatálise, entrega de drogas e biosensores (Prathap et al. 2012).

Mediante as informações que foram discutidas até o presente momento foram escolhidos sequências gênicas específicas que associadas a presença das nanopartículas SBA15 e SBA16 serão importantes para a melhor eficiência da identificação da bactéria *N. meningitidis* através de técnicas de PCR. Desta forma acreditamos que o diagnóstico poderá ser mais sensível, uma vez que em muitas situações o quadro clínico piora rapidamente, levando até a morte.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo foi avaliar se a presença de nanopartículas SBA15 e SBA16 em técnicas laboratoriais de biologia molecular, como PCR, melhoram a eficiência da detecção. Assim, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Estudo da interação de DNA genômico bacteriano e Nanopartículas de Sílica Mesoporosa SBA-15 e SBA-16 através de Espectroscopia de Dicroísmo Circular e Retardação em gel.
- Aplicação de Nanopartículas de Sílica Mesoporosa SBA-15 e SBA-16 em reações de PCR convencional e avaliação do seu efeito sobre a amplificação de DNA genômico bacteriano.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Nanopartículas de Sílica Mesoporosa SBA-15 e SBA-16

MSN SBA-15 e SBA-16 puras (sem funcionalização) foram escolhidas para o estudo porque se constituem no sistema mais simples possível.

As MSN SBA-15 e SBA-16 utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas e caracterizadas pela Prof. Dr. Edésia Martins Barros de Souza da Universidade Federal de Minas Gerais (Hollanda et al. 2011).

A síntese de MSN SBA-15 foi feita usando um copolímero tribloco Pluronic P123-PEO₂₀PPO₇₀-PEO₂₀ poli-[óxido de etileno]-poli[óxido de propileno]-poli[óxido de etileno] [EO₂₀PO₇₀EO₂₀] (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) como agente direcionador de estrutura. O copolímero P123 foi dissolvido em uma mistura de água destilada e HCl sob agitação, seguido pela adição de tetraetil ortosilicato. A mistura foi mantida a 35 °C por 24 horas, e posteriormente por 1 dia à 100 °C sob condições estáticas em uma autoclave revestida por teflon. O material obtido foi filtrado e secado a 40 °C e o surfactante foi removido por calcinação por 550 °C por 5 horas (Zhao et al. 1998). As MSN SBA-16 foram sintetizadas sob condições ácidas em uma faixa de concentração de 3 à 5% de Pluronic F127-EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆ (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆) diluído em temperatura ambiente. Após reagir por 20 horas foi obtido SBA-16 alto grau de pureza por aquecer o precipitado sólido da solução estoque a 80 °C por 2 dias (Rivera-Munoz, Huirache-Acuna 2010).

A Figura 4 evidencia os testes de caracterização que foram feitos para a MSN SBA-15. A imagem (a) foi capturada através de microscopia eletrônica de varredura e mostra uma alongação de 590 µm de partículas de forma vermicular. SBA-15 é composto por muitos

domínios em forma de corda com tamanhos médios de $1,7 \mu\text{m}$ agregados em uma macroestrutura em forma de trigo. A imagem (b), capturada através de microscopia eletrônica de transmissão, mostra um arranjo hexagonal de poros bem definidos quando o feixe de elétrons incidente foi paralelo ao eixo principal mesoporoso; já a imagem (c) demonstra canais unidirecionais quando o feixe de elétron foi perpendicular ao canal eixo (Hollanda et al. 2011).

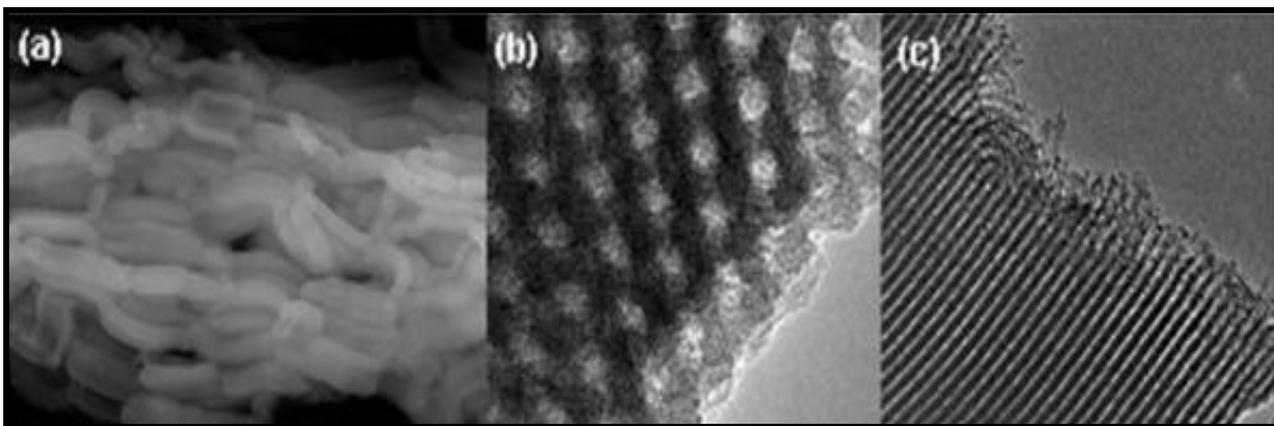


Figura 4: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de SBA-15 evidenciando a presença de alongados de partículas vermiculares de $590 \mu\text{m}$. Microscopia eletrônica de transmissão mostra um arranjo bem definido de poros hexagonais quando o (b) feixe de elétrons incide de forma paralela ao eixo principal do mesoporo e (c) canais unidirecionais quando o feixe de elétrons incide de forma perpendicular, evidenciando poros 2D (adaptado de Hollanda et al. 2011).

A Figura 5 evidencia os testes de caracterização que foram feitos para a MSN SBA-16. A imagem (a) foi capturada através de microscopia de varredura e mostra agregados de partículas arredondadas, com diâmetro de 15 a $20 \mu\text{m}$. Nas imagens (b) e (c), capturadas a partir de microscopia eletrônica de transmissão, podemos visualizar mesoporos cúbicos bem dispostos em 3D (Holanda et al. 2011).

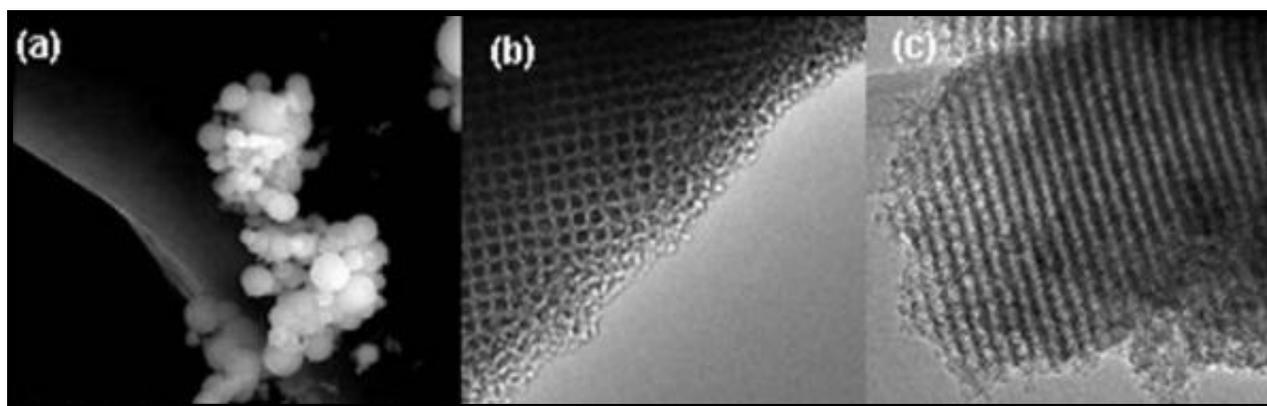


Figura 5: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura de SBA-16 exibe agregados de partículas de forma circular, com diâmetro de 15 a 20 μ m. Microscopia eletrônica de transmissão mostra um arranjo bem definido de poros cúbicos 3 D quando (b) vistos ao longo do eixo do poro e (c) perpendicular ao eixo do poro (adaptado de Hollanda et al. 2011).

Algumas propriedades dos mesoporos foram obtidos pela medida de adsorção de nitrogênio. Assim puderam ser obtidos dados de área superficial específica (A), diâmetro de poros (D) e volume de poros (V). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 1. As partículas SBA-15 apresentam maior área superficial (672 m².g⁻¹), diâmetro (5.7 η m) e volume (0.96 cm³.g⁻¹), quando comparadas com as SBA-16 (550 m².g⁻¹, 5.7 η m e 0.49 cm³.g⁻¹, respectivamente) (Hollanda et al 2011).

Tabela 1: Propriedades dos mesoporos de SBA-15 e SBA-16 obtidos pela medida de adsorção de nitrogênio. A = área superficial específica, D = diâmetro de poro e V= volume de poros (adaptado de Holanda et al 2011).

MSN	A (m ² .g ⁻¹)	D (η m)	V(cm ³ .g ⁻¹)
SBA-15	672	5.7	0.96
SBA-16	550	3.7	0.49

3.2. Análises de interação entre DNA e MSN

3.2.1. Afinidade entre DNA genômico e MSN SBA-15 e SBA-16 por retardação em Gel

O DNA genômico foi adicionado a diferentes quantidades de MSN SBA-15 e SBA-16 nas proporções DNA/MSN em ng/ng: 2/0,6, 2/1,2, 2/2,4 e 2/5, em meio aquoso. DNA genômico sozinho foi usado como controle.

O DNA genômico também foi adicionado a diferentes quantidades de MSN SBA-15 e SBA-16 em Solução Tampão e $MgCl_2$ na mesma concentração utilizada para PCR (20mM de Tris-HCl pH8.0, 50mM de KCl e 1,25mM de $MgCl_2$) nas proporções em ng/ng: 500/250, 500/500, 500/1.000, 500/2.500, 500/5.000, 500/25.000, 500/50.000. Também foram utilizadas MSN SBA-15 e SBA-16 sozinhas como controle. As amostras foram analisadas antes e depois do ciclo de PCR.

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio a 80V por 2 horas. O gel foi analisado em usando trasiluminador UV após tratamento com solução contendo 5% de Brometo de Etídio e fotografadas pelo sistema GelDoc It – Imaging System, com filtro vermelho utilizando-se o software VisionWorks @LS.

3.2.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

O Dicroísmo Circular (DC) é um fenômeno proveniente da interação entre moléculas quirais com raios eletromagnéticos circularmente polarizados. A absorção orientada para o lado esquerdo (anti-horário) ou direito (horário) da luz polarizada por moléculas quirais

diferentes é chamada de DC. A grandeza utilizada para descrever este fenômeno é a Elipticidade (ϵ) e é expressa em graus (Chang et al. 2012, Kypr et al. 2009). A espectroscopia de DC é muito sensível à mudança conformacional de polipeptídeos e proteínas e, por isso, tem sido largamente utilizada para investigação de estrutura secundária de proteínas e estudos espectrais de DNA (Chang et al. 2012).

A conformação da dupla fita de DNA pode dividi-la em três famílias: A, B e Z (Chang et al. 2012, Kypr et al. 2009), que podem ser visualizadas na Figura 6.

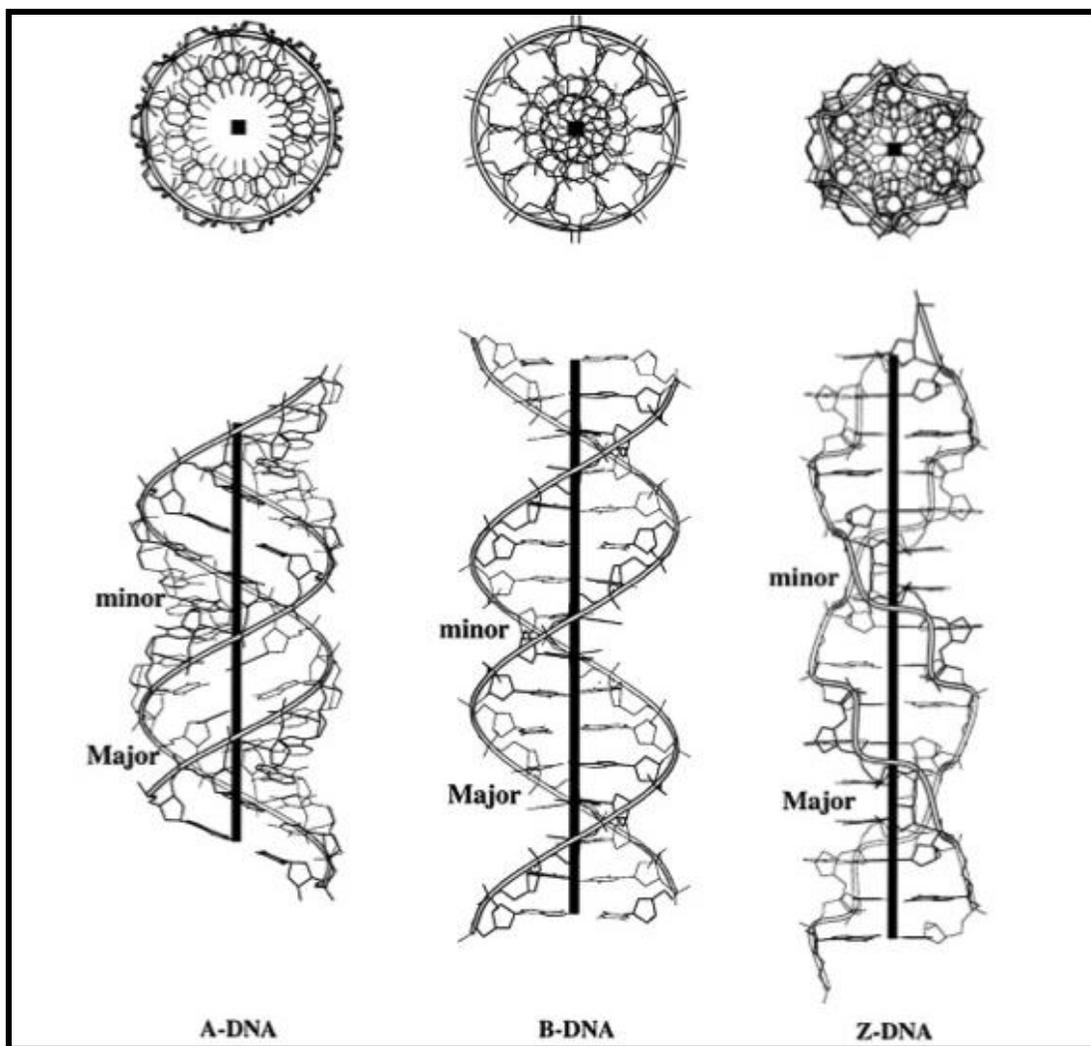


Figura 6: Conformações das duplas fitas de DNA: A-DNA, B-DNA e Z-DNA.

A estrutura mais comum é a B-DNA, orientada no sentido horário, tem estrutura mais longa e mais fina. A hélice completa uma volta a cada 3,4nm, ou seja 10 pares de bases. Seu espectro DC é caracterizado por uma banda de comprimento de onda longo positivo em cerca de 260-280nm e uma banda negativa em cerca de 245nm. A-DNA é uma dupla hélice α -helicoidal bastante semelhante a forma B-DNA, mas com estrutura helicoidal mais curta e compactada. A-DNA ocorre em condições de desidratação e é favorecida em condições de baixa quantidade de água, como soluções hidroalcólicas. O ligeiro aumento de pares de bases por rotação da hélice (cerca de 11 pares de base) e menor volta da fita de A-DNA comparado com B-DNA, resulta em maior compactação da hélice, impedindo o acesso por proteínas (Chang et al. 2012).

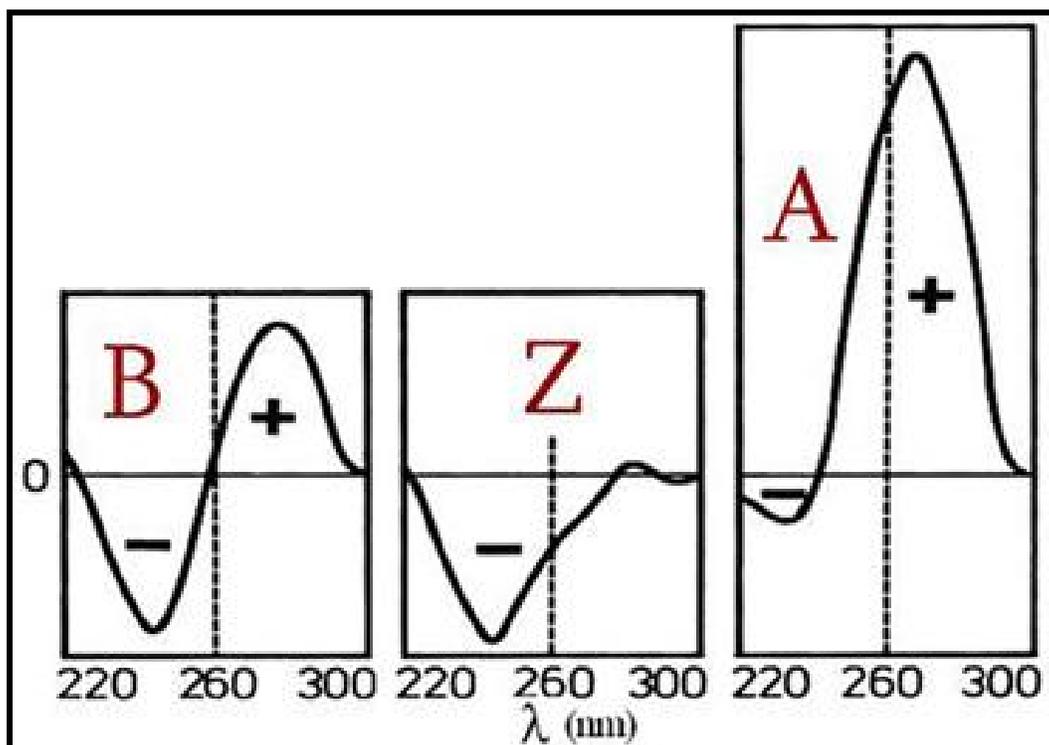


Figura 7: Espectro de Dicroísmo Circular característicos para as conformações das duplas fitas de DNA nas formas B-DNA, Z-DNA e A-DNA.

Como podemos visualizar na Figura 7, o espectro DC de A-DNA é caracterizado por uma banda dominante positiva a 260nm e uma banda negativa em 210nm. A forma Z-DNA é orientada no sentido anti-horário e é mais alongada e fina que B-DNA. Sua formação geralmente é desfavorável, mas pode ser promovida por algumas condições tais como: aumento do *stress* negativo helicoidal, quantidade de íons do meio e metilação do DNA. O espectro de DC do Z-DNA apresenta uma inversão com o espectro DC de B-DNA e apresentará banda negativa em cerca de 290nm, banda positiva em 260nm e banda profundamente negativa em 205nm (Chang et al. 2012).

DNA genômico foi adicionado a MSN SBA-15 e SBA-16 na proporção DNA/MSN em ng/ng de 200/200 por μL de Solução Tampão e MgCl_2 na mesma concentração utilizada para PCR (20mM de Tris-HCl pH8.0, 50mM de KCl e 1,25mM de MgCl_2). Também foram preparadas amostras na mesma proporção DNA/MSN que foram submetidos aos ciclos de PCR. Controles foram preparados com MSN SBA-15 e SBA-16 (sem PCR) e DNA (com e sem PCR) na concentração de 200ng/ μL de Tampão e MgCl_2 .

Os espectros de DC foram obtidos em um Espectropolarímetro J720- Jasco ORD 306, programado para adquirir em uma janela de 200 – 320 nm, na velocidade de 20 nm/min e acumulado em 8 scans. A aquisição foi realizada utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm e volume de 300 μL . Os gráficos estão apresentados utilizando as medidas de elipticidade em θ graus *versus* comprimento de onda em nm.

3.3. Técnicas de biologia molecular

3.3.1. Extração e quantificação de DNA genômico

A cepa padrão utilizada foi *Neisseria meningitidis* ATCC 23247 Sorogrupo B. A extração de DNA genômico foi realizada segundo Sambrook et al. 1989.

A cepa padrão bacteriana foi cultivada em Agar Chocolate. Algumas colônias foram isoladas, selecionadas e adicionadas a 400 µL de Tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0. Em seguida adicionou-se 70µL de SDS 10% e 20 µL de Proteinase K a 2 mg/mL. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos a 65°C. Foram adicionados 100µL de NaCl 5 M e 100 µL de CTAB/ NaCl pré aquecido a 65°C. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 1 minuto e novamente incubados a 65°C por 10 minutos. Adicionou-se 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram novamente agitados em vórtex por 10 segundos. Centrifugou-se a 10000 g por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Adicionou-se 300 µL de isopropanol a -20°C e manteve-se a -20°C por 30 minutos. Centrifugou, novamente, a 10000 g por 5 minutos, e formou-se um *pellet* no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* 1 mL de Etanol 100% a -20°C. Centrifugou 10000 g por 5 minutos e descartou o sobrenadante. Repetiu-se este último procedimento utilizando Etanol 70% a -20°C. Os tubos foram deixados com o *pellet* secando à temperatura ambiente por 2 horas. O *pellet* foi ressuscitado com 50µL de água para injetável (Sambrook et al. 1989).

O DNA genômico de *N.meningitidis* extraído foi quantificado em NanoDrop Thermo Scientific® e diluído para 250 ng/µL com água para injetáveis para ser utilizado nas reações de PCR convencional.

3.3.2. Reações de Polimerização em Cadeia da Taq Polimerase – PCR

Convencional

3.3.2.1. Parâmetros gerais da reação

O gene utilizado para detecção de *Neisseria meningitidis* ATCC 23247 Sorogrupo B foi o *synD*, gene responsável pela formação da cápsula do tipo B. Na Tabela 2 podemos observar a sequência dos *primers* utilizados na PCR convencional (*syn D* e *tbp2*), o fragmento amplificado, também chamado de amplicom, é de 526 pares de base (pb)

Tabela 2: Sequência de primers utilizados em PCR convencional (*syn D* e *tbp2* e tamanho do fragmento amplificado).

Primers	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)
<i>syn D</i>	5' CACTTCTTAAATCTGCAGAATTCGC 3'	526
<i>tbp2</i>	5' GAATTCACCTCAGACCCAGTACTTC 3'	

Na Figura 8 observa-se um esquema do gene *syn D* feito no programa pDraw® com as regiões de anelamento dos *primers*: *synD* e *tbp2*. A sequência do gene foi obtida no Genbank –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – *N. meningitidis* linhagem M04-240196. Sequência de referência no NCBI: NC.017515.1.

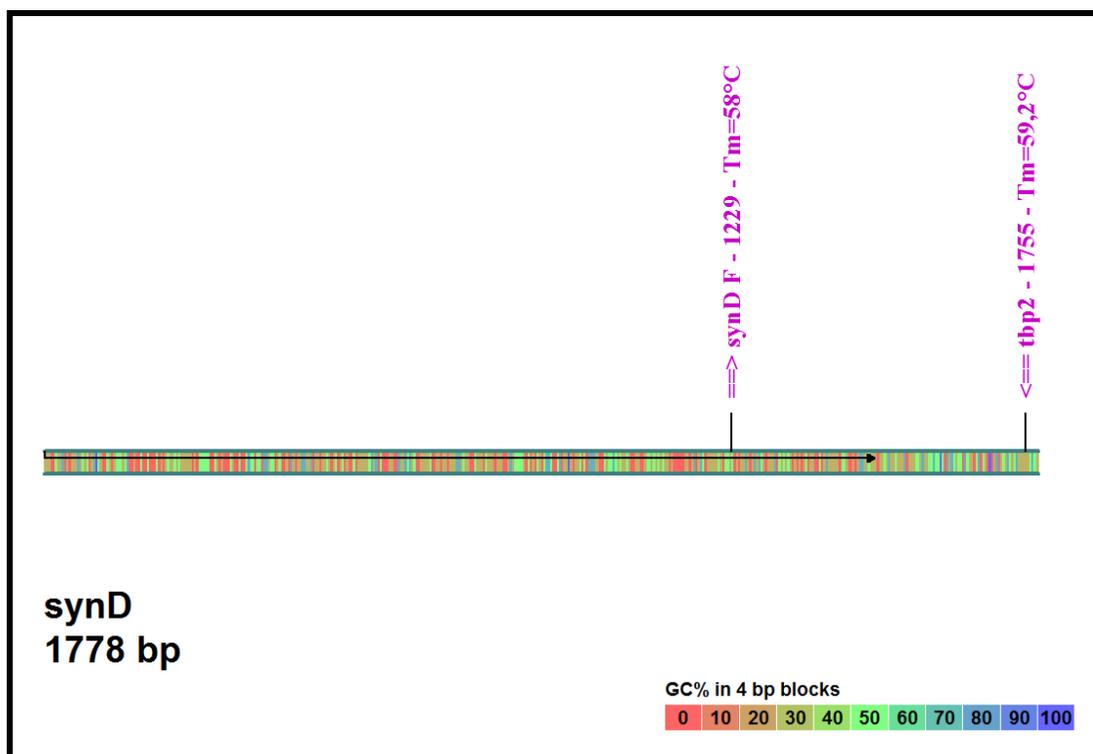


Figura 8: Esquema do gene *synD* feito no programa pDRAW® com as regiões de anelamento dos primers *synD* e *tbp2*. A sequência do gene foi obtida do Genbank –<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – *N. meningitidis* linhagem M04-240196. Sequência de referência no NCBI: NC.017515.1.

Tecnicamente as PCRs foram realizadas de acordo com protocolo proposto pela Taq DNA Polimerase Recombinant Invitrogen®. O volume final da reação foi de 50 µL contendo 2U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 20mM de Tris-HCl pH8.0 (Invitrogen®), 50mM de KCl (Invitrogen®), 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (Promega®), 2% Dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich®) e 0,5µM de cada *primer*. A quantidade de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) foi determinada a partir de um gradiente de concentrações e a quantidade de DNA variou de acordo com a PCR realizada.

A amplificação foi realizada em termociclador com um primeiro ciclo de desnaturação a 96°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 20 segundos,

anelamento a 52°C por 30 segundos e polimerização a 72°C por 40 segundos. Um ciclo final de polimerização foi realizado por 10 minutos a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de Agarose 2% e a banda de DNA foi analisado em transiluminador UV após tratamento com solução contendo 5% de Brometo de Etídeo e fotografadas pelo sistema GelDoc It – Imaging System, com filtro vermelho utilizando-se o software VisionWorks ®LS.

3.3.2.2. Gradiente de MgCl₂

A concentração de MgCl₂ inicial proposta pela Invitrogen® era de 1,5mM para um volume final de 50 µL de reação. Um gradiente foi realizado com 8 concentrações diferentes do reagente (em mM): 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75 e 2.

As PCRs foram realizadas utilizando-se uma concentração de 10 ng/µL de DNA de *N. meningitidis* ATCC 23247 Sorogrupo B e o gene utilizado para sua detecção foi o *synD*, gene responsável pela cápsula do tipo B.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de Agarose 2% e a banda de DNA foi analisado em transiluminador UV após tratamento com solução contendo 5% de Brometo de Etídeo e fotografadas pelo sistema GelDoc It – Imaging System, com filtro vermelho utilizando-se o software VisionWorks ®LS.

3.3.2.3. Limite de Detecção de DNA da PCR

O limite de detecção (LD) da PCR convencional foi realizado em dois gradientes de DNA genômico de *N. meningitidis* ATCC 23247 Sorogrupo B e o gene utilizado para sua

detecção foi o *synD*, gene responsável pela cápsula do tipo B. A PCR foi realizada segundo procedimento citado anteriormente.

Primeiramente foram testadas as seguintes concentrações de DNA em ng/μL de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78. Posteriormente estas concentrações foram diminuídas para as seguintes em pg/μL de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 e 0,39.

Após serem submetidas à PCR os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de Agarose 2% e a banda de DNA foi analisado em transiluminador UV após tratamento com solução contendo 5% de Brometo de Etídeo e fotografadas pelo sistema GelDoc It – Imaging System, com filtro vermelho utilizando-se o software VisionWorks ©LS.

3.3.2.4. Gradiente de MSN SBA-15 e SBA-16

A partir da determinação do LD de DNA foi selecionada a concentração do LD, uma concentração de DNA acima do limite e uma abaixo. Estas três concentrações de DNA foram submetidas a PCRs com as seguintes concentrações de MSN SBA15 e SBA16 em ng/μL: 6,25, 12,5, 25 e 50.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de Agarose 2% e a banda de DNA foi analisado em transiluminador UV após tratamento com solução contendo 5% de Brometo de Etídeo e fotografadas pelo sistema GelDoc It – Imaging System, com filtro vermelho utilizando-se o software VisionWorks ©LS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Afinidade entre DNA genômico e MSN SBA-15 e SBA-16 por retardamento em gel

Como podemos observar pelas bandas do gel da Figura 9, as MSN SBA-15 e SBA-16 não retardam completamente o escoamento do DNA pelo gel de agarose nas concentrações testadas. Também não há diferença expressiva entre a interação entre DNA-SBA-15 e DNA-SBA-16. Desta forma, conclui-se que, possivelmente, a interação entre DNA e SBA-15 e 16 ocorra de maneira fraca.

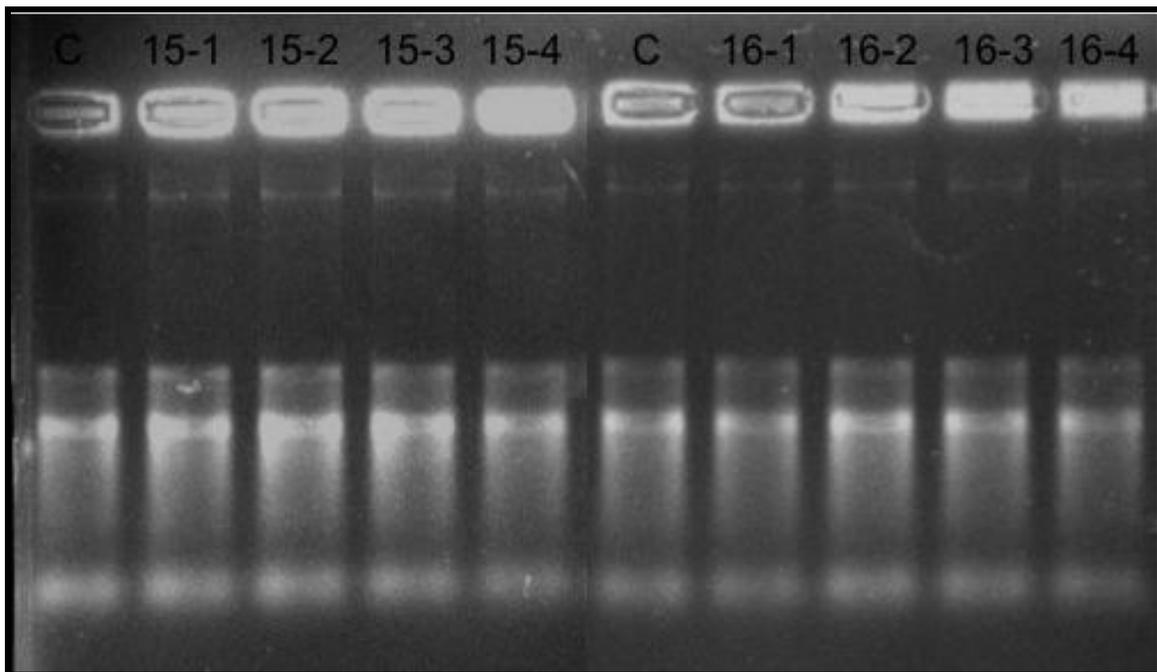


Figura 9: Gel de afinidade entre DNA e MSN SBA-15 e 16 em meio aquoso. C=Controle DNA, 15 = MSN SBA15, 16 = MSN SBA-16. Números de 1 a 4 correspondem, respectivamente às proporções DNA/MSN em ng/ng: 2/0,6, 2/1,2, 2/2,4 e 2/5.

Podemos perceber pelas Figuras 10 e 11 que há grande diferença do gel antes e após a PCR. Aparentemente não há diferença de interação entre DNA e MSN SBA-15 e SBA-16 antes da PCR, como já havíamos concluído na retardação e gel em meio aquoso. Mas após a PCR as bandas não aparecem mais no gel nem para MSN SBA-15 e nem para SBA-16. Isso sugere que a PCR pode favorecer a interação entre estas MSN e DNA dificultando a intercalação e emissão de fluorescência pelo brometo de etídeo. As bandas 8 e 8P nas duas figuras representam o controle de MSN puras (na Figura 1 SBA-15 e na Figura 2 SBA-16). Pode-se concluir que as MSN não interagem com o brometo de etídeo de forma a alterar a fluorescência emitida e, desta forma, conclui-se que em todos os géis realizados a emissão de fluorescência foi apenas do intercalamento do DNA com brometo de etídeo.

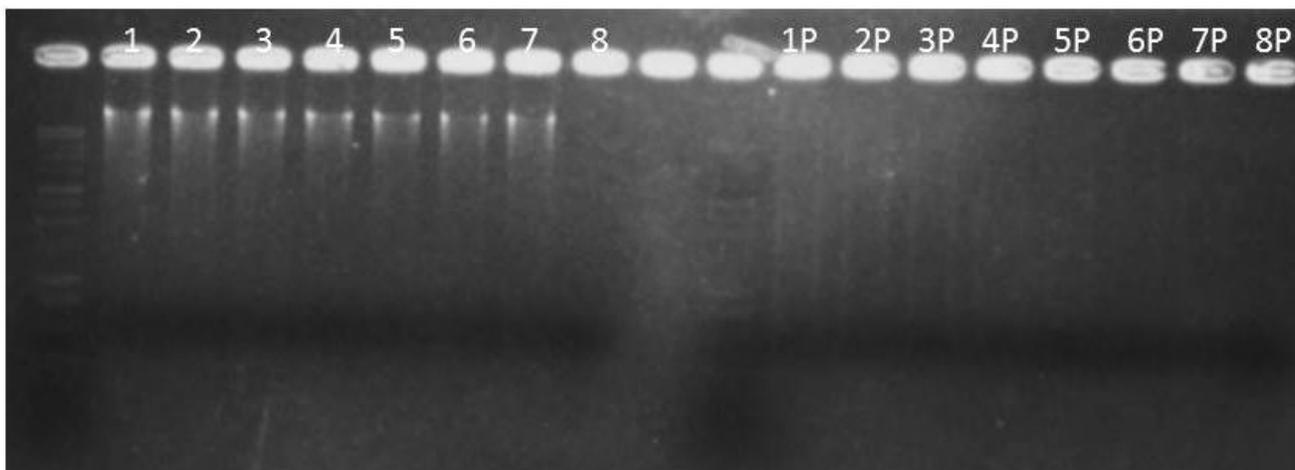


Figura 10: Gel de afinidade entre DNA e MSN SBA-15 em Solução Tampão e $MgCl_2$. Números de 1 a 7 correspondem, respectivamente às proporções DNA/MSN em ng/ng: 500/250, 500/500, 500/1.000, 500/2.500, 500/5.000, 500/25.000, 500/50.000 antes das PCR e os números 1P a 7P correspondem à mesma proporção de DNA e MSN SBA-15 após PCR. As bandas 8 e 8P corresponde à MSN SBA-15 pura.

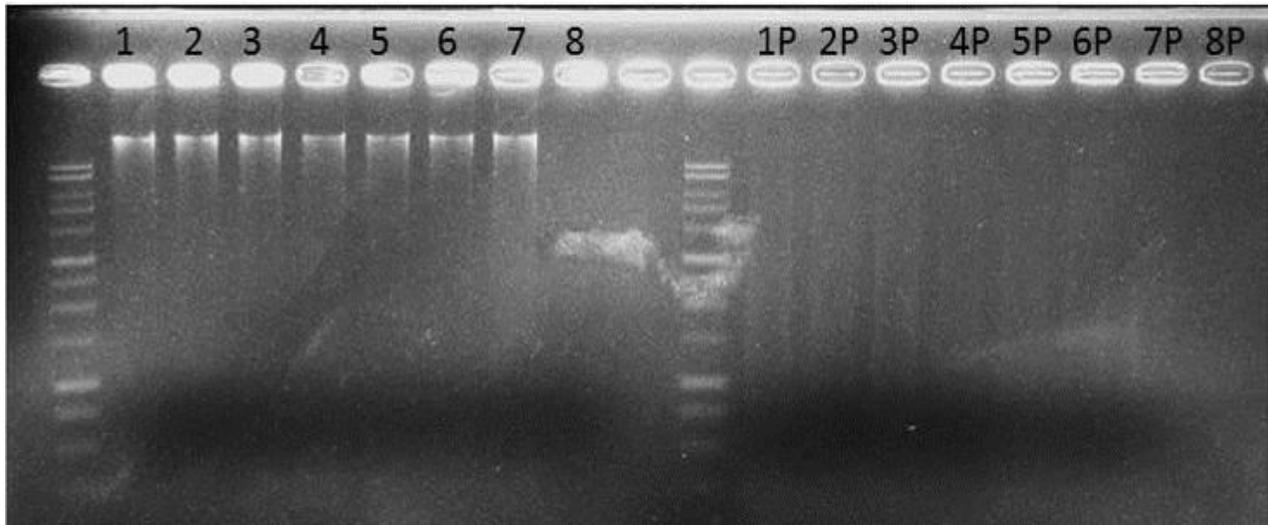


Figure 11:: Gel de afinidade entre DNA e MSN SBA-15 em Solução Tampão e $MgCl_2$. Números de 1 a 7 correspondem, respectivamente às proporções DNA/MSN em ng/ng: em: 500/250, 500/500, 500/1.000, 500/2.500, 500/5.000, 500/25.000, 500/50.000 antes das PCR e os números 1P a 7P correspondem à mesma proporção de DNA e MSN SBA-15 após PCR. As bandas 8 e 8P corresponde à MSN SBA-15 pura.

4.2. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

As amostras foram preparadas em solução tampão de PCR e $MgCl_2$ para mimetizar o que ocorre com o DNA na PCR, já que a quantidade de íons presentes no meio pode alterar a compactação de α -hélice e até promover mudanças conformacionais do DNA. Da mesma forma, as amostras foram submetidas aos ciclos e PCR no qual ocorre mudanças de temperatura que irão promover abertura e fechamento da dupla fita de DNA.

Na Figura 12 pode-se observar que houve uma pequena alteração na conformação de DNA antes e depois da reação de PCR, provavelmente por causa da ação da temperatura dos ciclos que fizeram com que o DNA se desenovelasse, abrisse e fechasse sua fita, deixando sua estrutura mais frouxa, e com isso causando uma diminuição da elipticidade.

Na Figura 13 podemos observar a interação entre MSN SBA-15 e SBA-16 e o DNA sem a ocorrência de PCR. Há pequena variação da elipticidade quando comparado com o DNA controle. Os dados obtidos confirmam os dados da literatura (Bitar et al. 2012, Melzak et al. 1996) que propõe que a interação através dos grupos silanol das MSN com os grupos fosfato presentes no DNA não é forte a ponto de promover mudanças conformacionais na forma do DNA. Também podemos observar que SBA-15 e 16 interagem de maneira semelhante com o DNA já que as curvas das duas MSN praticamente se sobrepõem.

A Figura 14 demonstra a interação entre DNA e MSN SBA15 e 16 quando submetidas a PCR. Observa-se que a interação DNA-SBA-15 é menos intensa que a interação DNA-SBA-16 pois ocorre maior aumento da elipticidade com a SBA-16 do que com a SBA-15 quando comparado ao DNA também submetido à PCR.

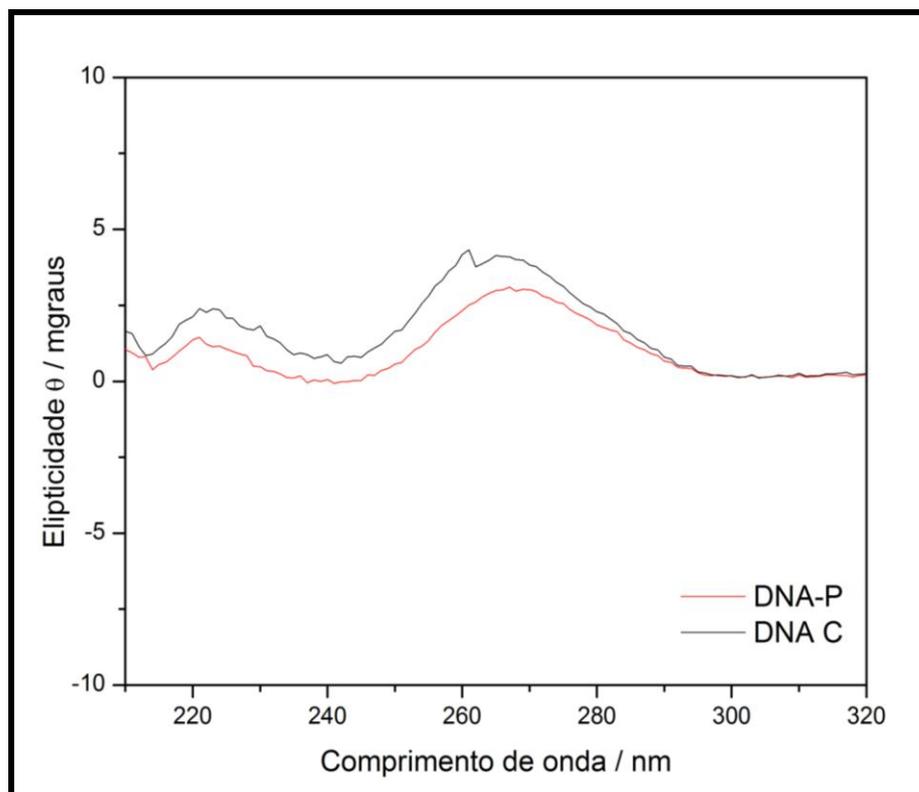


Figura 12: Espectro DC de DNA antes (DNA C) e após (DNA P) a PCR

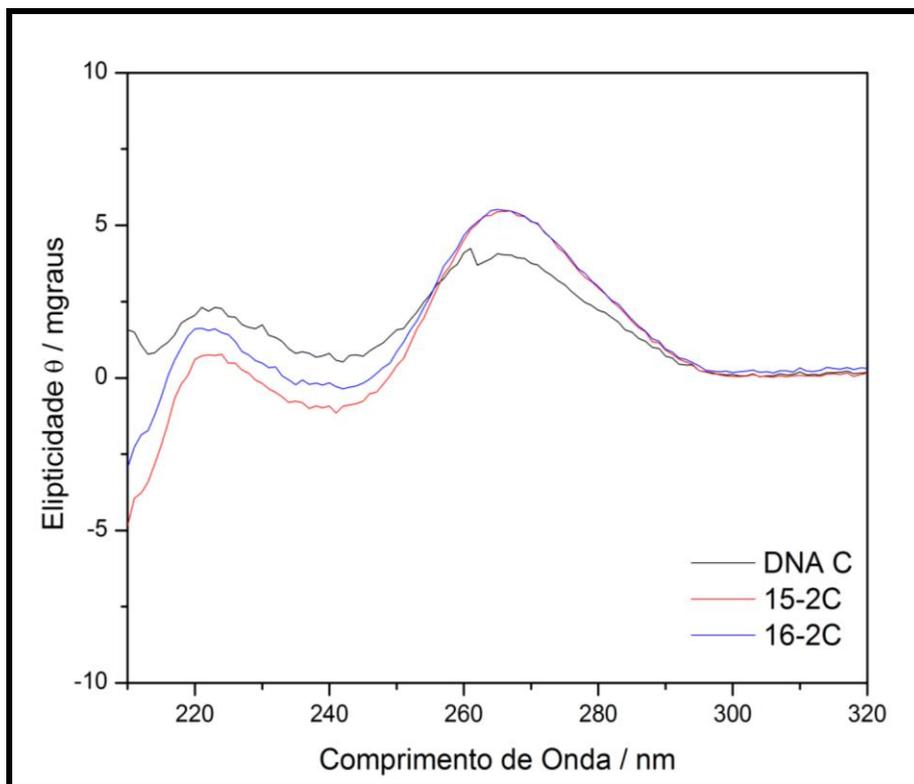


Figura 13: Espectro de DC de interação entre DNA-SBA-15 e DNA-SBA-16 antes da PCR

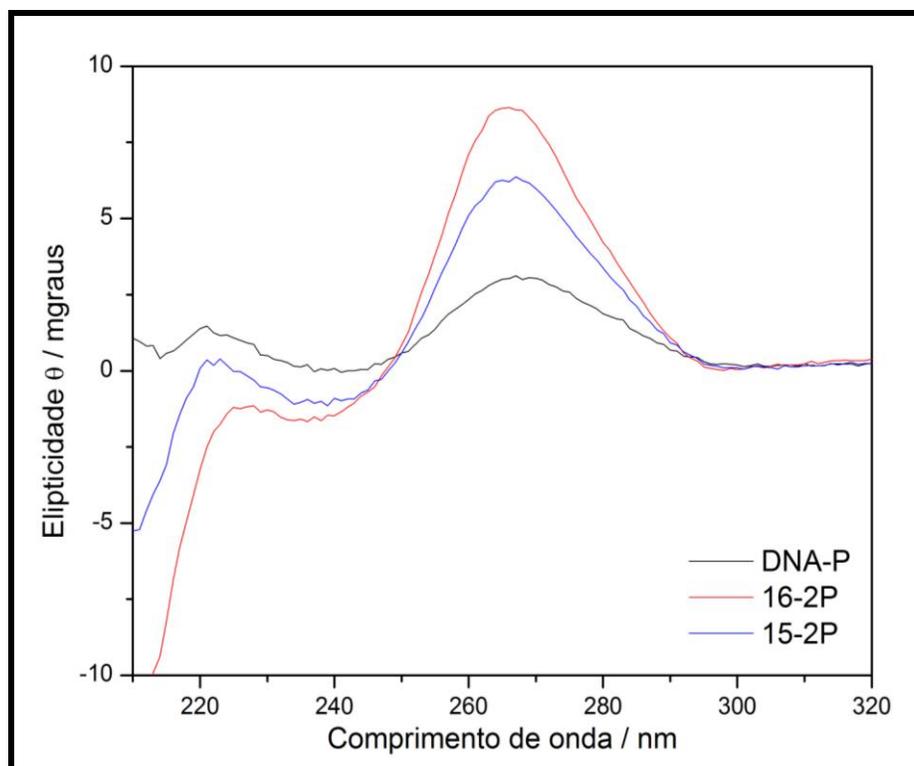


Figura 14: Espectro de DC de interação entre DNA-SBA-15 e DNA-SBA-16 antes da PCR.

A partir dos dados obtidos pode-se sugerir que, com a abertura e fechamento da dupla fita de DNA durante a PCR, ocorra uma maior exposição dos sítios de DNA que interagem com os grupos silanol das MSN, aumentando a interação quando comparado com DNA-MSN não submetidos a PCR. Desta forma os ciclos de PCR favorecem a interação entre DNA e MSN.

Além disso também podemos observar que há grande variação entre DNA-SBA-15 e DNA-SBA-16. Podemos sugerir que esta diferença de interação ocorra devido à própria estrutura e tamanho dos agregados de SBA-15 e SBA-16. Dados de caracterização destas MSN demonstram que SBA-15 formam agregados menores, mas suas MSN possuem tamanho individual maior quando comparado à SBA-16 (Hollanda et al 2011). Podemos sugerir que o menor tamanho das SBA-16 facilite seu acesso ao DNA quando ocorre a desnaturação durante o ciclo de PCR e por isso ocorra maior interação quando comparado com a SBA-15.

Já que a reação de PCR favorece a interação entre DNA e MSN SBA-15 e SBA-16, estas foram aplicadas a reações de PCR convencional para avaliar e estas MSN podem ser aplicadas na detecção de *N. meningitidis*, tornando o método mais sensível para a detecção de DNA genômico desta bactéria.

4.3. Padronização da reação de PCR

4.3.1. Gradiente de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)

O $MgCl_2$ é co-fator da Taq Polimerase, enzima responsável pela polimerização de DNA durante a PCR. A determinação da quantidade ideal de $MgCl_2$ na reação proporcionará o

funcionamento ótimo da enzima atingindo eficiência máxima na amplificação de DNA.

Desta forma foram testadas as seguintes concentrações de $MgCl_2$ (em mM): 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75 e 2. Como pode-se observar pela Figura 15, a amplificação pode ser melhor visualizada nas bandas 5 e 7, que correspondem, respectivamente, às concentrações de 1,25mM e 1,75mM.

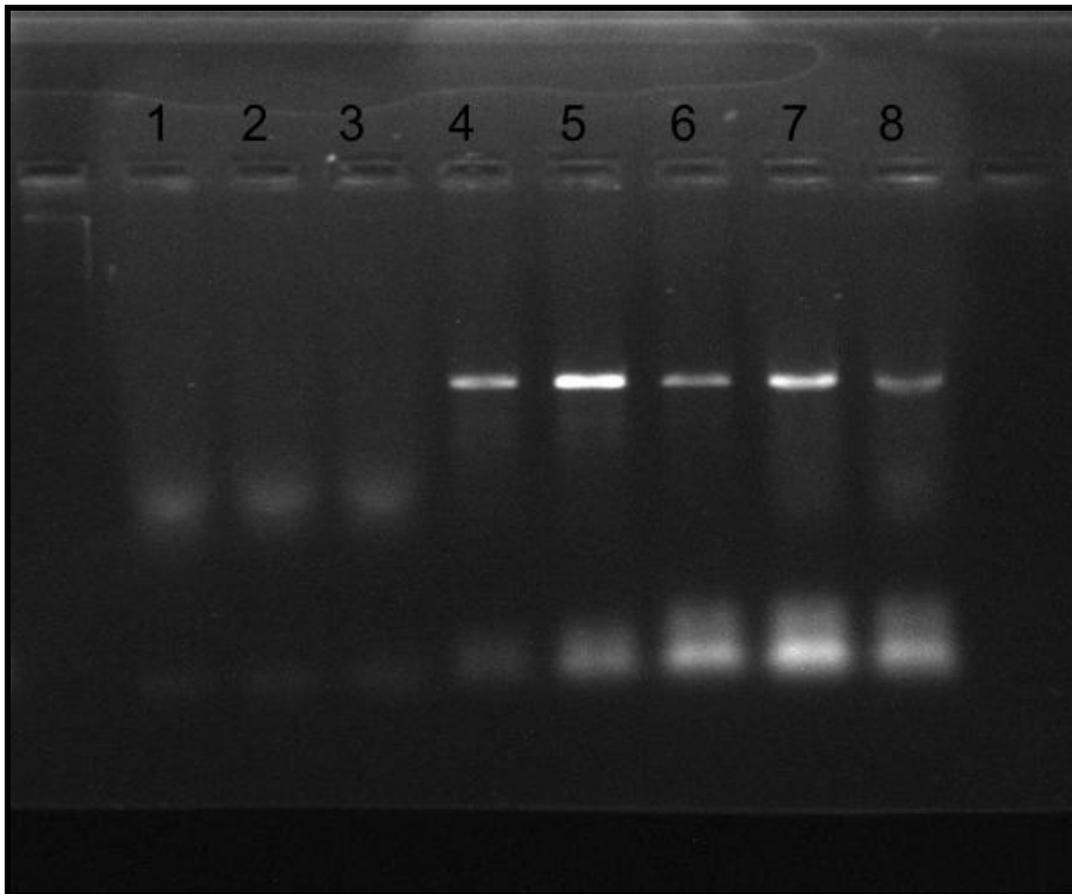


Figura 15: Gradiente de Cloreto de Magnésio. As bandas de 1 a 8 correspondem às concentrações de $MgCl_2$ (em mM): 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75 e 2.

A concentração de $MgCl_2$ utilizada para os demais experimentos foi a de 1,25mM (banda 5), já que obteve o mesmo padrão de amplificação que a de 1,75mM e menor quantidade de reagente pode ser utilizada na reação.

4.3.2. Limite de detecção de DNA da PCR

O LD de DNA amplificado foi realizado com o objetivo de se determinar qual a quantidade mínima de DNA que a PCR consegue amplificar nas condições descritas.

Inicialmente foram utilizadas as seguintes concentrações de DNA em $\text{ng}/\mu\text{L}$ de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78. Como pode-se observar pela Figura 16 houve amplificação de todas as concentrações de DNA citadas.

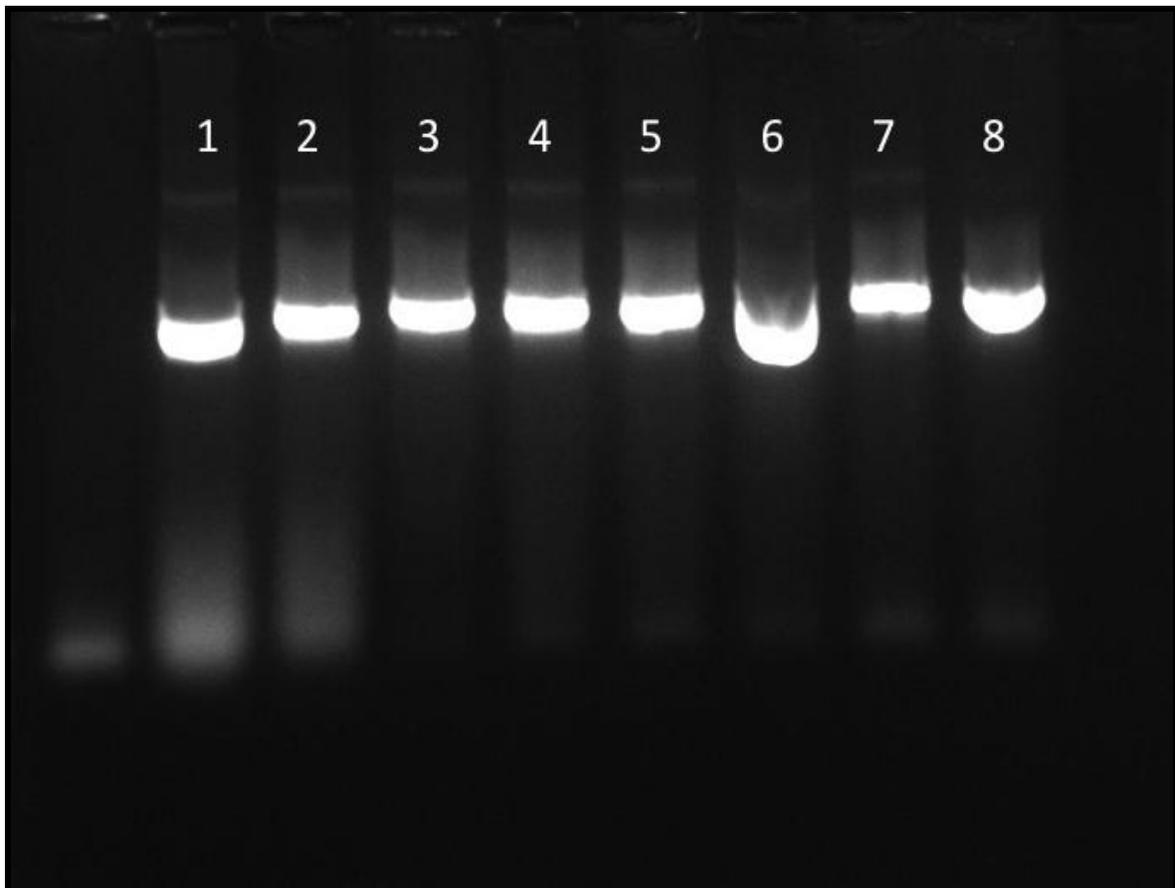


Figura 16: Gradiente de DNA. As bandas de 1 a 8 correspondem às seguintes concentrações de DNA em $\text{ng}/\mu\text{L}$ de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 e 0,78.

Desta forma a concentração de DNA foi diminuída, desta vez para $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 e 0,39. Na Figura 17 podemos perceber que a última amplificação ocorreu na banda 6, que corresponde à concentração de 3,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo este, então o LD de DNA da PCR nas condições citadas.

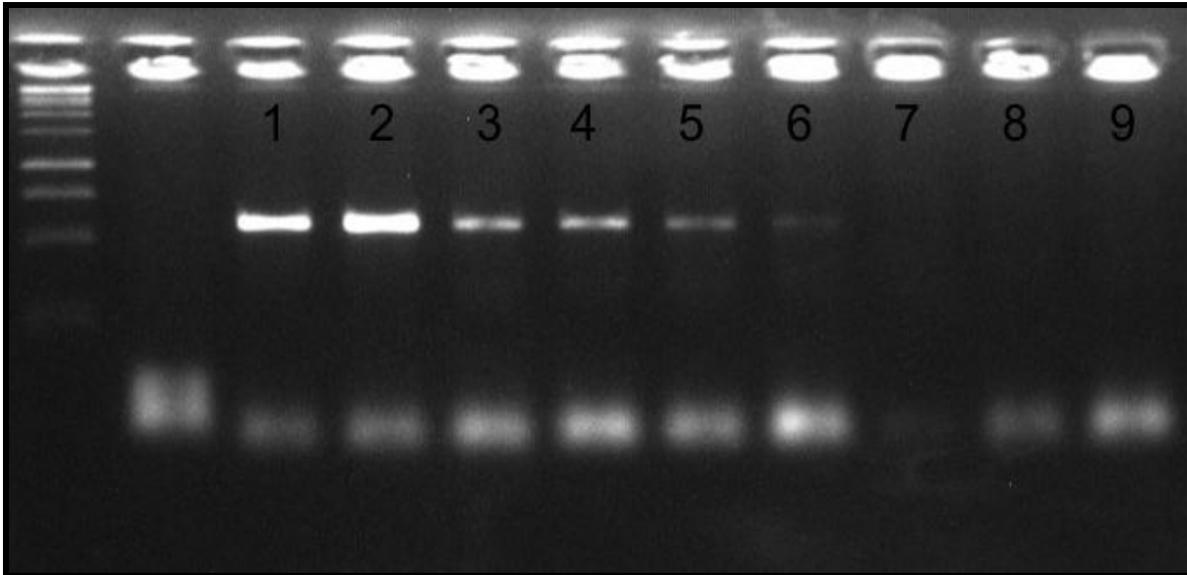


Figure 17: Gradiente de DNA. As bandas de 1 a 9 correspondem, respectivamente, às seguintes concentrações de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de reação: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 e 0,39.

4.4. Gradiente de MSN SBA-15 e SBA-16

A diminuição do LD de DNA da reação é extremamente importante nos casos em que a quantidade de DNA extraída da cultura e, principalmente, diretamente do material biológico é muito pequena. Desta forma, a reação de PCR pode ter sua sensibilidade aumentada, melhorando o diagnóstico de meningites e DM causadas por pequena quantidade de bactérias.

A partir da determinação do LD de DNA, foi selecionada a concentração de DNA do LD (3,13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), uma concentração acima (6,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e uma concentração abaixo (1,56 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A PCR foi adjuvada com diferentes concentrações de MSN SBA-15 e SBA-16 com o objetivo de se diminuir a concentração de DNA do LD. As concentrações de MSN SBA-15 e SBA-16 utilizadas em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: 6,25, 12,5, 25,0 e 50,0.

A Figura 18 corresponde à reação adjuvada com SBA-15. A banda 1 corresponde ao branco da reação, ou seja, a reação não contendo DNA e nem MSN usada como controle de contaminação dos reagentes utilizados. As bandas de 2 a 4 correspondem ao controle da PCR sem MSN com DNA nas concentrações em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: 6,25, 3,13 e 1,56. As bandas de 5 a 16 correspondem às concentrações de DNA anteriores adjuvadas com 4 concentrações de MSN (em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: 6,25, 12,5, 25,0 e 50,0). Da mesma forma a Figura 19 corresponde à reação adjuvada com SBA-16.

Como podemos perceber pelas bandas presentes nas Figuras 18 e 19 houve pequena variação na intensidade das bandas, o que pode ser atribuído a pequenas variações da técnica como pequenas variações na concentração dos reagentes devido à pipetagem ou à homogeneização de reagentes, principalmente DNA e MSN que se encontram em pequenas concentrações.

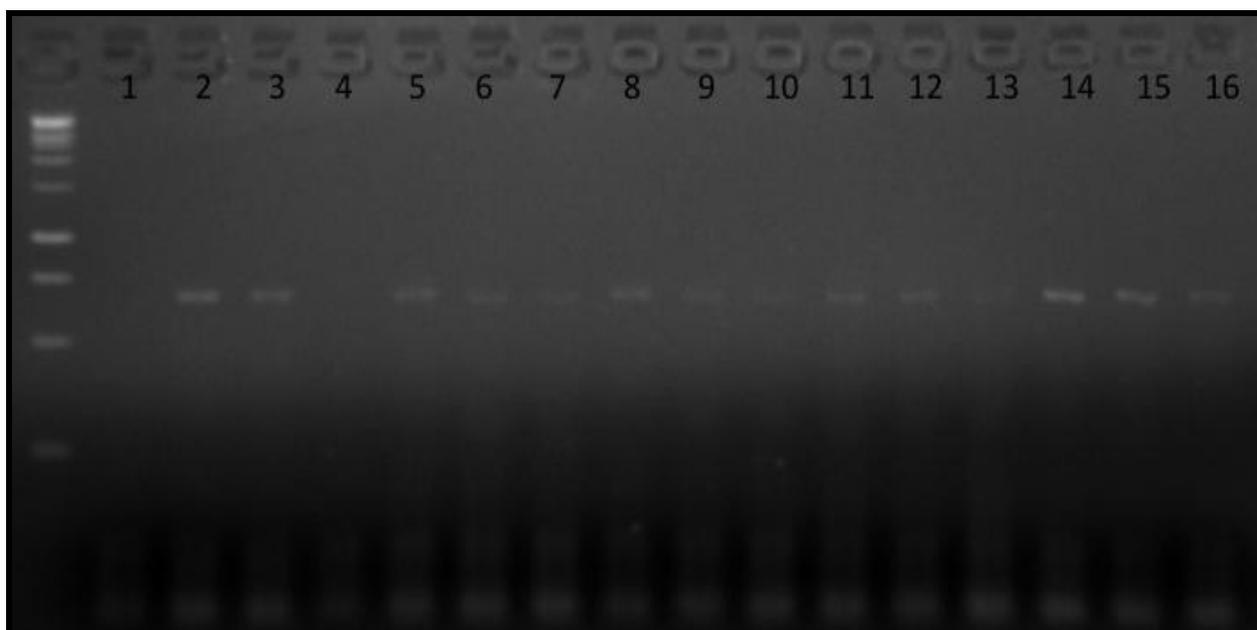


Figura 18: Gradiente de MSN SBA-15 na PCR. A Banda 1 corresponde ao Branco da reação. As Bandas 2 a 4 correspondem a PCR sem MSN (banda-concentrações em $\text{pg}/\mu\text{L}$: 2-6,25, 3-3,13 e 4-1,56). As bandas 5 a 7 correspondem às mesmas concentrações de DNA anteriores adjuvadas com 6,25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de MSN SBA-15, bandas 8 a 10 com 12,5 $\text{pg}/\mu\text{L}$, bandas 11 a 13 com 25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ e 14 a 16 com 50 $\text{pg}/\mu\text{L}$, respectivamente.

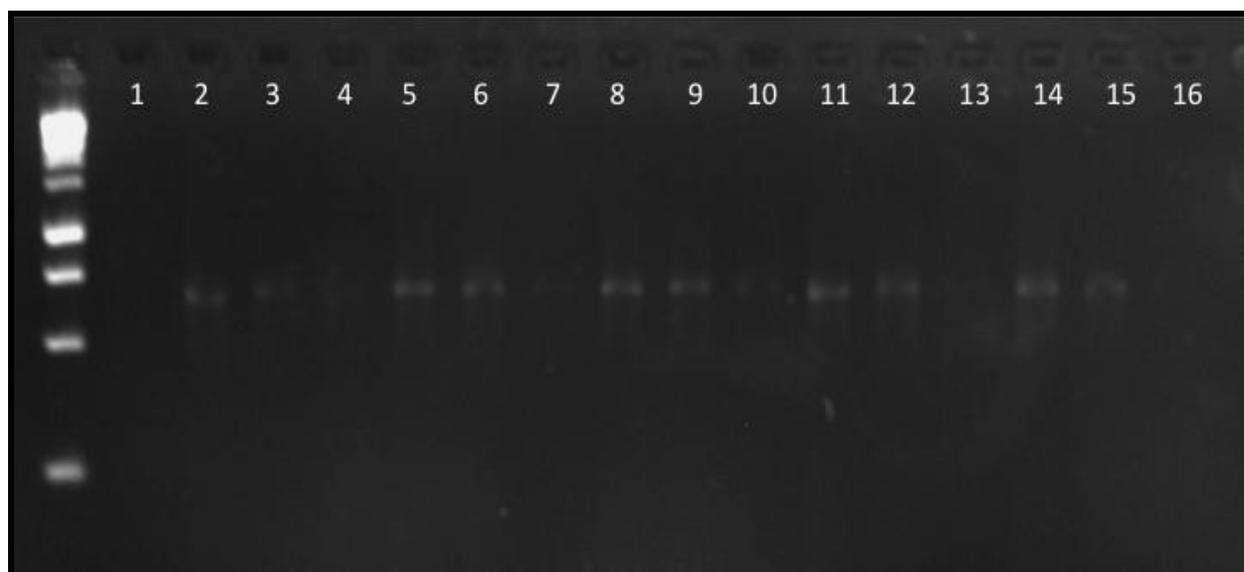


Figura 19: Gradiente de MSN SBA-16 na PCR. A Banda 1 corresponde ao Branco da reação. As Bandas 2 a 4 correspondem a PCR sem MSN (banda-concentrações em $\text{pg}/\mu\text{L}$: 2-6,25, 3-3,13 e 4-1,56). As bandas 5 a 7 correspondem às mesmas concentrações de DNA anteriores adjuvadas com 6,25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de SBA-16, bandas 8 a 10 com 12,5 $\text{pg}/\mu\text{L}$, bandas 11 a 13 com 25 $\text{pg}/\mu\text{L}$ e 14 a 16 com 50 $\text{pg}/\mu\text{L}$, respectivamente.

Desta forma, não podemos afirmar que as MSN SBA-15 e SBA-16 alteram a amplificação de DNA nas concentrações testadas já que a PCR convencional não permite calcular se há ou não significância da amplificação obtida.

Assim, outras técnicas quantitativas de biologia molecular, como a PCR Quantitativa (Q-PCR), poderiam dar a informação de significância da aplicação destas MSN em testes diagnósticos moleculares.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

N. meningitis causa doenças de rápida progressão e que podem causar a morte rápida do paciente. A biologia molecular é uma ferramenta de diagnóstico importante para este tipo de doença e, se associada à nanotecnologia, pode melhorar o desempenho das técnicas já existentes.

Através dos resultados obtidos nos experimentos de retardamento em gel e dicroísmo circular podemos concluir que a interação entre DNA e as MSNs SBA-15 e SBA-16 é fraca e que a reação de PCR promove maior interação entre DNA e estas MSN. A utilização de MSN em reações de PCR Convencional para a detecção de *N. meningitidis* não demonstrou aumento da sensibilidade da técnica.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

Azzazy HME, Mansour MMH, Kazmierczak SC. Nonodiagnostics: A New Frontier of Clinical Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry*, 2006. 52 (7): 1238-1246.

Biju V. *Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy*. *Chem Soc Rev*, 2014; 43(3): 737-962.

Bitar A, Nasir MA, Fessi H, Elaissari A. *Silica-based nanoparticles for biomedical applications*. *Drug Discovery Today*, 2012; 17(19/20): 1147- 1154.

Boving KB, Pedersen LN, Moller JK. *Eight-Plex PCR and Liquid-Array Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Cerebrospinal Fluid from Patients with Suspected Meningites*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009; 47 (4): 908-913.

Carbonelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Barette JL, Ferroni A, Gutman L, Nassif Xavier. *MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory*. *Clinical Biochemistry*, 2011; 44: 104-109.

Chang YM, Chen CKM, Hou MH. Conformational Changes in DNA upon Ligand Binding Monitored by Circular Dichroism. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012. 13: 3394-3413.

Chen Y, Chen H, Shi J. *In Vivo Bio-Safety Evaluations of Diagnostic/Therapeutic Applications of Chemically Designed Mesoporous Sílica Nanoparticles*. *Advanced Materials*, 2013. 25: 3144-3176.

Erlich KS and Congeni BL. *Importance of circulating antibodies in protection against meningococcal disease*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2012; 8(8): 1029-1035.

Girard MP, Preziosi MP, Aguado MPK. *A review of vaccine research and development: Meningococcal disease*. *Vaccine*, 2006; 24: 4692-4700.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. *An Introduction to Genetics Analysis*. 8th Edition. WH Freeman Co. NY, 2005. p 360-362.

Guia de Vigilância Epidemiológica, 7^a Edição. ISBN 978-85-334-1632-1. Ministério da Saúde, 2009.

Harrison OB, Brueggemann AB, Caugant DA, Ende A, Frosch M, Gray S, Heuberger S, Krisova P, Olcen P, Slack M, Taha MK, Maiden MCJ. *Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by Neisseria meningitides, Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae, a review*. *Microbiology*, 2011. 157: 2181-2195.

Hollanda LM, Cury GCG, Pereira RFC, Ferreira GA, Sousa A, Sousa EMB, Lancellotti M. *Effect of mesoporous silica under Neisseria meningitidis transformation process: enviromental effects under meningococci transformation.* Journal of Nanobiotechnology, 2011. 9(28): 1-8.

Ilina EN, Borovskaya AD, Malakhova MM, Vereshchagin VA, Kubanova AA, Kruglov AN, Svistunova TS, Gazarian TM, Kostrewa M, Govorun VM. *Direct Bacterial Profiling by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for identification of Pathogenic Neisseria.* Journal of Molecular Diagnosis, 2009; 11(1): 75-86.

Kaittanis C, Santra S, Perez JM. *Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2010; 62: 408-423.

Kotilainen P, Jalava J, Meurman O, Lehtonen OP, Rintala E, Seppala OP, Eerola E, Nikkari S. *Diagnosis of Meningococcal Meningitis by Broad-Range Bacterial PCR with Cerebrospinal Fluid.* Journal of Clinical Microbiology, 1998; 36(8): 2205-2209.

Kwon S, Singh RK, Perez RA, Néel EAA, Kim HW, Chrzanowski. *Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery.* Journal of Tissue Engineering, 2013. 4:1-17.

Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphismo of DNA. Nucleic Acids Research, 2009. 37(6): 1713-1725.

Liu F, Choi KS, Park TJ, Lee SY, Seo TS. *Graphene-based eletrochemical biosensor for pathogenic vírus detection.* BioChip Journal, 2011; 5(2): 123–128.

Managing meningites epidemics in África: A quick reference guide health authorits and health-care workers. Geneva, World Health Organization, 2010. (WHO/HSE/GAR/ERI/2010.4)

Melzak KA, Sherwood CS, Turner RFB, Haynest CA. *Diving Forces for DNA Adsoption to Silica in Perchlorate Solutions.* Journal of Colloid and Interface Science, 1996; 181: 635-644.

Passarge E. Color Atlas of Genetics. 3rd Edition. Georg Thieme Verlag, 2007. p 66-67.

Prathap MUA, Kaur B, Srivastava R. *Direct synthesis of metal oxide incorporated mensoporous SBA-15, and their applications in non-enzymatic sensing of glucose.* Journal of Colloid and Interface Science, 2012. 381: 143-151.

Rivera-Munoz EM and Huirache-Acuna R. *Sol Gel-Derived SBA-16 Mesoporous Material.* Int J Mol Sci, 2010. 11(9): 3069-3086.

Shinde SB, Fernandes CB, Patravale VB. *Recent trends in in-vitro nanodiagnosics for detection of pathogens.* Journal of Controlled Release, 2012. 159:164-180.

Stevens JJW, Lebeau K, Mertens M, Tendeloo GV, Cool P, Vansant EF. Investigation of the Morphology of the Mesoporous SBA-16 e SBA-15 Materials. *J. Phys. Chem. B*, 2006. 110 (18): 9183-9187.

Syed MA. *Advances in nanodiagnostic techniques for microbial agents*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. 51:391-400.

Taha Muhamed-Kheir. *Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of Neisseria meningitides*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38 (2): 855-857.

Tzeng Yih-Ling and Stephens David S. *Epidemiology and pathogenesis of Neisseria meningitides*. *Microbes and Infection*, 2000; 2: 687-700.

Vogel U. *Molecular epidemiology of meningococci: Application of DNA sequence typing*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010. 300: 415-420.

Wang X, Theodore J, Malr R, Trujillo-Lopez E, Plessis M, Wolter N, Baughman AL, Hatcher C, Vuong J, Lott L, Gottberg A, Sacchi C, McDonald JM, Messonier NE, Mayer LW. *Clinical Validation of Multiplex Real-Time PCR Assays for Detection of Bacterial Meningitis Pathogens*. *Journal of Clinica Microbiology*, 2012. 50(3)702-708.

Zhao DJ. Feng Q, Huo N, Melosh GH, Fredrickson BF, Chmelka GD. *Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores*. *Sciense*, 1998; 279(5350): 548-552.

Zhu H, Wang Q, Wen L, Xu J, Shao Z, Chen M, Chen M, Reeves P, Cao B, Wang L. *Development of a Multiplex PCR Assay for Detection and Genogrouping of Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012; 50 (1): 46-51.