

**JULIA NOGUEIRA VARELA**

**“ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA E FUNCIONALIDADE DO  
GENE OMPP2 DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* CEPA NÃO  
TIPADA E MULTIRESISTENTE: PERSPECTIVAS SOBRE  
AQUISIÇÃO DE RESISTÊNCIA E VACINAS”**

**CAMPINAS**

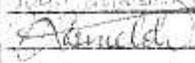
**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

Julia Nogueira Varela

**“Estudo da transferência e funcionalidade do gene OmpP2 de  
*Haemophilus influenzae* cepa não tipada e multiresistente: perspectivas  
sobre aquisição de resistência e vacinas”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
JULIA NOGUEIRA VARELA  
  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia e Tecnologia de Produtos  
Biotivos, na área de Fármacos,  
Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

CAMPINAS,  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V423e Varela, Julia Nogueira, 1986-  
Estudo da transferência e funcionalidade do gene  
OmpP2 de *Haemophilus influenzae* cepa não tipada e  
multiresistente: perspectivas sobre aquisição de  
resistência e vacinas / Julia Nogueira Varela. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. *Haemophilus influenzae*. 2. Vacinas. 3.  
Proteínas de membrana. 4. Resistência microbiana a  
medicamentos. I. Lancellotti, Marcelo, 1976-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Study of the transference and function of the OmpP2 gene from  
*Haemophilus influenzae* non typable and multiresistent strain: perspectives in  
vaccines and antibiotic resistance

**Palavras-chave em Inglês:**

*Haemophilus influenzae*

Vaccines

Membrane proteins

Microbial drug resistance

**Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

**Titulação:** Mestra em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

**Banca examinadora:**

Marcelo Lancellotti [Orientador]

Marcus Alexandre Finzi Corat

Fernanda de Pace

**Data da defesa:** 12-03-2013

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

Campinas, 12 de março de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

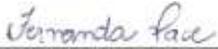
Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (orientador)



---

Assinatura

Dra. Fernanda de Pace



---

Assinatura

Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat



---

Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

---

Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

---

Assinatura

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Estudo da transferência e funcionalidade do gene OmpP2 de Haemophilus influenzae cepa não tipada e multiresistente: perspectivas sobre aquisição de resistência e vacinas":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( X ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 52012 , Instituição: Unicamp.

( ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição:

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição:

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Julia Nogueira Varela

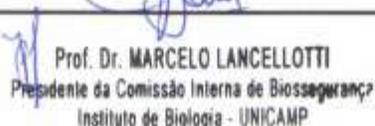


Orientador: Marcelo Lancellotti

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI  
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
Instituto de Biologia - UNICAMP

## **Agradecimentos:**

Ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti pela orientação, pelos ensinamentos tanto teóricos quanto práticos, por ter me apresentado ao trabalho no âmbito da Biotecnologia, pelos conselhos, pelo apoio e pela paciência e entendimento.

Ao Dr Marcus Corat, e à Dra Fernanda Pace pela participação na banca de defesa permitindo a melhoria desse trabalho e a sua apresentação atual.

Ao Prof Dr. Helder Ceragioli pela participação na pré-banca contrinuindo para melhorar esse trabalho.

Aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos, inclusive nos de fraqueza, fazendo com que eu acreditasse em mim mesma e que tudo seria possível.

A Deus que faz com que as coisas mesmo nas horas mais sombrias e duvidosas façam sentido.

Aos meus colegas de laboratório (Labiotec): Mário, Rafaella, Danilo, Cecília, Ana, Gisele, Alice, Ives, Washington, Paulo, Carol, Natali pelo apoio e ajuda em todos os momentos, pelas noites em claro no laboratório, pelas risadas e lágrimas.

A Dra Luciana pelo apoio, pelas palavras de amizade e pela energia positiva.

As minhas amigas: Carol, Val, Michele, Carol Cabelo, Theo pela paciência pelos conselhos, risadas e bons momentos que fizeram com que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão pela insistência em sempre me colocar para cima e por estar sempre lá.

A minha vó Bira e Tia Dora, minha segunda mãe que sempre me apoia, sem as quais eu com certeza nem teria chegada até a Unicamp.

A Dra Mary Ann Foglio que me introduziu ao mundo da pesquisa e me ajudou a me encontrar no mesmo.

A Unicamp pela possibilidade de me ajudar a me realizar tanto em termos de carreira quanto em termos de ser humano.

As agências de fomento : Fapesp, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos os outros meus familiares que me ajudaram de certa maneira a chegar aqui hoje e continuam me apoiando e dando forças para seguir em frente.

A todos que participaram desse trabalho direta ou indiretamente fica o meu Muito Obrigada!

**Alea Jacta est.**

## Lista de Abreviaturas

μL: microlitro

Atb: antibiótico

ATCC: American Type Culture Collection

A549: célula imortalizada de carcinoma epithelial humano

BHI: Brain Heart Infusion

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

DNA: ácido desoxirribonucléico

g: gramas

Hec1B: célula imortalizada de adenocarcinoma de endométrio humano

Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b

HiM: *Haemophilus influenzae* Mutante

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IM: internal membrane, membrana interna

INCQS-FIOCRUZ: Instituto Nacional de Controle e Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz

LBMB – Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana – IB – UNICAMP

LOS: lipooligossacarideo

M: mutada

mL: mililitro

m/v: massa por volume

NOG: Nanopartículas de óxido de grafeno

OG: óxido de grafeno

OM: outer membrane: membrana externa

Omp - Outer membrane Protein (proteína externa de membrana)

PBP2: penicillin-binding protein 2

PS: periplasmatic space (espaço periplasmático)

RNA: ácido ribonucléico

SFB: Soro Fetal Bovino

UFC: Unidade formadora de colônia

v/v: volume por volume

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Vacinas comerciais existentes para *Haemophilus influenzae* nos EUA

Tabela 2: Linhagens de *Haemophilus influenzae* utilizadas neste trabalho

Tabela 3: Lista de Oligonuclotídeos utilizados para PCR *ompP2*

Tabela 4: Teste de concentração inibitória mínima - CIM

## Lista de Figuras

Figura 1: Posicionamento proteínas de membrana do tipo porina em *H. influenzae*

Figura 2: Fotos de Mev das nanopartículas de óxido de grafeno utilizadas nesse trabalho

Figura 3: Gráfico da taxa de transformação sem e com a presença de nanopartículas de óxido de grafeno

Figura 4: Gráfico de citotoxicidade de cloranfenicol em linhagens celulares de A549

Figura 5: Gráfico de citotoxicidade de cloranfenicol em linhagens celulares de Hec1B

Figura 6: Gráfico de taxa de adesão de cepas selvagens em A549

Figura 7: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutantes em A549

Figura 8: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas x cepas selvagens em A549

Figura 9: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas x cepas selvagens em A549 com a presença de antibiótico

Figura 10: Gráfico da taxa de adesão de cepas selvagens em Hec1B

Figura 11: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutantes em Hec1B

Figura 12: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas x selvagens em Hec1B com a presença de antibiótico

Figura 13: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas x selvagens em Hec1B

Figura 14: Modelo tridimensional da Porina de *H. influenzae*

## RESUMO:

*Haemophilus influenzae* é uma bactéria causadora de doenças tipicamente associadas ao trato respiratório superior e inferior. Tal bactéria é classificada em linhagens capsuladas e não capsuladas - as não tipadas. As grandes responsáveis por patologias mais severas são as capsuladas, especialmente as do sorotipo b, a existência de uma vacina para somente esse sorotipo, faz com que ocorra uma emergência de casos com *H. influenzae* não tipado - NTHi. A crescente resistência à antibióticos dessa bactéria está associada a plasmídios de resistência, bem como sua competência natural. A presença desse patógeno é maior em países nos quais não existe acesso a vacina, devido ao alto custo da mesma, que acabam utilizando antibióticos mais acessíveis como o cloranfenicol no tratamento. Esse trabalho estudou a transferência horizontal do gene *ompP2* em diversas cepas de *H. influenzae* com a ajuda de nanopartículas de óxido de grafeno. Essas nanopartículas mimetizam uma atmosfera rica em partículas suspensas como as grandes cidades e zonas de agricultura precoce, já que, nesses locais ocorre com maior frequência mutações e adaptações desse patógeno. Quando as nanopartículas encontravam-se no meio de cultura, verificou-se um aumento da taxa de transformação dessas bactérias. Assim como uma modificação no padrão de adesão celular das bactérias mutadas quando comparadas com as selvagens em linhagens celulares distintas e expostas ao antibiótico de resistência, levando a um aumento da taxa de adesão das cepas mutadas com relação as cepas selvagens. Como esse gene é e de possível aquisição entre cepas de *H. influenzae* em seu ambiente natural seria possível utilizá-lo para obtenção de um proteína recombinante, com possível antigenicidade. Uma vez que a taxa de adesão aumenta com a presença do mesmo, levando a uma possível nova vacina que também protegeria contra cepas não tipadas e não somente capsuladas.

## **ABSTRACT:**

*Haemophilus influenzae* is a bacteria that causes diseases typically associated with the upper and lower respiratory tract. Their strains are divided in capsulated and non-capsulated - the non typable. The major responsible for more severe cases are the capsulated types, specially the b type. The existence of a vaccine for the serotype b, allows the emergence of cases of non typable *H. influenzae* - NTHi. The growing resistance is associated with resistance plasmids, and with its natural competence, that enables the bacteria to acquire DNA fragments between its' species. Since this pathogen is common in countries that there is no access to this vaccine, therefore the use of accessible and cheaper antibiotics, such as chloramphenicol for treatment is. This work studied the horizontal transference of the *ompP2* gene from multiresistant strains of *H. influenzae*, with the aid of grafen oxide nanoparticles, that mimesis an atmosphere rich in suspended particles, such as great urban areas and ancient agricultural zones. In these environments a great frequency in mutation and adaptations of this bacteria is verified. When we look at the adhesion patterns of this bacteria we can see that it is modified when they are mutated and exposed to the resistance antibiotic. Leading to an augmentation of the adhesion patterns when we compare to the wild strains. Since this gene was present in all strains and it was of easy acquisition between strains, it would be possible to use it to obtain a recombinant protein with likely antigen properties. Because the adhesion tax enhances with the presence of this gene. Leading to a possible new vaccine target, for NTHi and capsulated strains also.

## SUMÁRIO:

INTRODUÇÃO .....	1
Caracterização Bioquímica e Classificação de <i>Haemophilus influenzae</i>	
Epidemiologia e patogenicidade	
Vacinas existente	
Resistência a antibióticos	
Porinas - gene <i>ompP2</i>	
Modelos de estudo	
Transferência Horizontal de genes	
Nanopartículas	
OBJETIVOS .....	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Meios de Cultura	
Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar	
Ágar Chololate	
Suplemento de NAD e Hemina	
Ágar Chololate Cloranfenicol	
Métodos	
Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento	
Cultivo Celular	
Extração DNA Genômico	
Solução de CTAB/NaCl	
Metologia de Extração de DNA Genômico	
Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	
Transferência de genes	
Processo de Transformação	
Teste de concentração inibitória mínima - (CIM)	
Ensaio de citotoxicidade	
Soluções Utilizadas	
Solução Salina Tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4	
Corante Vermelho Neutro	
Solução Formol - cálcio	
Solução Etanol- Ácido Acético	
Ensaio de Citotoxicidade	
Determinação da Viabilidade Celular	
Ensaio de Adesão	
Caracterização do percentual de adesão de <i>Haemophilus influenzae</i> em monoculturas celulares	
Análise Estatística	
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
Amplificação do gene <i>ompP2</i>	
Óxido de grafeno	
Taxa de transformação com e sem óxido de grafeno (OG)	
Verificação da incorporação do gene <i>ompP2</i>	
Citotoxicidade	
Concentração inibitória mínima	

CONCLUSÃO .....	51
PERSPECTIVAS.....	52
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

### Caracterização Bioquímica e Classificação de *Haemophilus influenzae*

*Haemophilus influenzae* é um cocobacilo pleomórfico Gram negativo que usualmente coloniza o trato respiratório superior em humanos, pertencente a família *Pasteurellaceae* (Holt 1994; Wolf and Daley 2007).

A respeito de sua classificação, tal espécie pode ser subdividida por dois métodos: biotipos e sorotipos. A divisão em biotipos baseia-se na presença e produção de enzimas como a ornitina descarboxilase, a urease, e aquelas que atuam na fermentação do açúcar D-xilose e na produção de indol. Esta classificação permite subdividir o *Haemophilus influenzae* em 9 biotipos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e *aegyptius* (Holt 1994).

O *H. influenzae* é também classificado com base na produção de uma cápsula polissacarídica sendo a mesma composta por um polímero de 3-β-D-ribose-(1-1)-ribitol fosfato (PRP) cuja estrutura antigênica divide as linhagens capsuladas em 6 sorotipos imunologicamente conhecidos: a - f (Kroll, Langford et al. 1991) e as cepas não tipadas - que não produzem cápsulas (Gilsdorf, Marrs et al. 2004). Outros métodos de tipagem como análise de proteínas de membrana, perfis de lipopolissacarídeo e eletroforese de isoenzimas, foram usados para estudar a epidemiologia e patogenia do *H. influenzae* (Lancellotti, Pace et al. 2008)

### Epidemiologia e patogenicidade

O *H. influenzae* tipo b (Hib) é o mais invasivo dos seis sorotipos capsulares (a-f) e é reconhecido como causador de meningite, sendo um dos patógenos mais relevantes de infecções do trato

respiratório superior e inferior em crianças e adultos (Rahman, Hossain et al. 2008; Bae, Lee et al. 2010). Tal microrganismo é também responsável pela maioria dos quadros de meningites em crianças entre 2 e 5 anos.(Turk 1984; Booy, Heath et al. 1997) A meningite causada por *H. influenzae* é responsável por 30–50% do total de meningites bacterianas, e a cepa do tipo b, é o segundo patógeno mais comum causador de pneumonia em crianças chinesas (Wang, Vuori-Holopainen et al. 2002). Nos EUA, antes da vacinação infantil contra o *H. influenzae* b ter início em 1991, ele era o patógeno mais usual causador de meningite bacteriana nas mesmas.(Singleton, Hammitt et al. 2006) Nos EUA o número anual de incidência de meningite causada por Hib entre crianças com 0 a 4 anos era de 50 a 60 por 100.000, antes da existência da vacina, com uma média de 54 casos por 100.000 crianças. (Peltola 2000).

As formas não tipadas de *H. influenzae* (NTHi) são tipicamente associadas com doenças moderadas do trato respiratório superior em crianças e pneumonia em adultos portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou fibrose cística. Doenças causadas pelo *H. influenzae* invasivo de cepas não tipadas afetam neonatos e adultos portadores de fibrose cística ou DPOC, mas raramente ocorrem em crianças com mais de 5 anos(Wang, Tseng et al. 2005).

O NTHi é o agente bacteriano predominante na otite média em crianças, sendo responsável por múltiplas doenças do trato respiratório superior e inferior de crianças e adultos. Apesar de ser uma bactéria comensal no trato respiratório superior de pessoas saudáveis, é uma causa importante de infecções persistentes, agudas e recorrentes no trato respiratório humano (Turk 1984).

A meningite bacteriana requer um diagnóstico precoce e um tratamento antimicrobiano empírico. Todavia, os sintomas e sinais dependem da idade da criança, duração da doença e do agente

etiológico. As características clínicas da meningite bacteriana em crianças menores podem ser sutis, variáveis, não específicas, ou mesmo ausentes (Kim, Choi et al.).

A cápsula polissacarídica é considerada o principal antígeno deste microorganismo (Kroll *et al.*, 1991) e um outro fator de patogenia são os lipopolissacarídeos (LPS) associados a proteínas externas de membranas (OMP), os quais são potentes iniciadores de febre e distúrbios de coagulação e choque em humanos e modelos experimentais (Galdiero, Capasso et al. 2003). Sendo assim a busca por formas de tratamento para o *H. influenzae* tipo b foi iniciada levando a descoberta e aprimoramento da vacina para o mesmo com o decorrer dos anos.

### **Vacinas existentes**

Poucas vacinas na história induziram tamanho declínio de incidência da doença em um período tão curto de tempo, como as vacinas conjugadas para Hib (Peltola 2000). Antes da introdução de vacinas conjugadas de *Haemophilus b*, o *H. influenzae* tipo b (Hib) era a causa mais frequente de meningite bacteriana e a principal causa de infecção bacteriana sistêmica severa em crianças no mundo (Cochi, Broome et al. 1985). Além da proteção contra infecções invasivas, a vacina conjugada de Hib previne a colonização ou porte assintomático de Hib na orofaringe. Essa propriedade permite uma menor prevalência de porte de Hib na população, diminuindo o risco de infecção mesmo entre crianças não vacinadas reduzindo a transmissão (Baggett, Hennessy et al. 2006).

A organização mundial de saúde (OMS) incorporou a vacina de Hib nos programas de rotina de imunização para todas as crianças, conforme apropriado para capacidades e prioridades de cada nação (2000; Organization 2011; Who 2011). Diversas vacinas conjugadas de Hib estão

disponíveis a partir de diferentes fabricantes. Todos esses fabricantes usam o material capsular polissacarídico da bactéria ligando-o ao toxóide tetânico, toxóide difitérico (ou uma proteína similar ao toxóide difitérico), ou uma mistura de proteínas de outras bactérias. Cada uma dessas combinações mostrou-se eficiente na prevenção de doenças por Hib (2000).

Existem 3 tipos de vacinas conjugadas licenciadas para Hib para usos em crianças menores de 15 meses nos EUA. A vacina conjugada de Hib com poliribosilribitol fosfato de proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis* (PRP-OMP) (PedVaxHIB; Merck, Rahway, NJ) provém os níveis de anticorpos necessários que são tidos como preventivos contra a doença invasiva em um curto espaço de tempo. Entretanto, a vacinação com PRP-OMP não alcança os altos picos de concentração de anticorpos depois de um ciclo completo como qualquer uma das vacinas de oligosacarídeo CRM197 Hib ou a vacina de poliribosilribitol fosfato de toxóide tetânico (PRP-T) (Galil, Singleton et al. 1999).

A tabela a seguir apresenta as vacinas existentes contra o *H. influenzae*, todas são para o sorotipo b, baseadas em cápsula polissacarídica.

Tabela 1: Vacinas comercialmente existentes contra *Haemophilus influenzae* nos EUA

(Varela JN 2012)

Vacinas Existentes	Dosagem	Vantagens	Desvantagens
<b>Hib - <i>Haemophilus b</i> Vacina conjugada (Tetanus Toxoid Conjugate) ActHIB® - Sanofi- Pasteur</b>	1 dose de 0.5ml contém 10µg de polissacarídeo purificado, 3 doses com intervalo de 6 a 8 semanas. (Intramuscular)	Pode ser utilizada em crianças com 2 meses de idade - alcançando alto pico de concentração de anticorpos	Somente protege contra o sorotipo b, não oferece cobertura para grupos emergentes não capsulados (Galil, Singleton et al. 1999; 2009)
<b><i>Haemophilus b</i> Vacina conjugada (Diphtheria CRM197 Proteína Conjugada) HibTITER®- Wyeth Lederle</b>	1 dose contém 10µg de sacarídeo purificado de <i>Haemophilus b</i> e 25µg de proteína CRM197. 3 doses com um intervalo de 2 mese. (Intramuscular)	Alcança um alto pico de concentração de anticorpos, oferecendo proteção a longo termo.	Somente protege contra o sorotipo b, não oferece cobertura para grupos emergentes não capsulados. (Galil, Singleton et al. 1999)
<b>PedvaxHIB® líquida [<i>Haemophilus b</i> Conjugate Vaccine (Meningococcal Protein Conjugate)]- Merk</b>	1 dose contém 7.5 µg de <i>Haemophilus b</i> PRP (Cápsula polisacarídica), 125µ de <i>N. meningitidis</i> OMPC e 225µg of alumínio (Intramuscular)	Providencia o nível de anticorpos pensados mais cedo contra doenças invasivas.	Somente protege contra o tipo b e não oferece cobertura contra os grupos emergentes não capsulados. Não atinge um pico de concentração de anticorpos como as outras duas vacinas. (1998; Galil, Singleton et al. 1999)

Como a vacinação para *H. influenzae* somente previne contra o sorotipo b, mesmo esse sendo o mais invasivo, doenças pediátricas associadas com o *H. influenzae* ainda apresentam grande importância e a busca por tratamentos eficazes contra a mesma é continua, bem como a de uma vacina, uma vez que, com a difusão do patógeno começa também a surgir uma resistência do mesmo aos antibióticos utilizados nos tratamentos.

## Resistência a antibióticos

A resistência a agentes antimicrobianos do *H. Influenzae* evoluiu significativamente durante os últimos 20 anos. Essa resistência é maior em antibióticos beta-lactâmicos já que ocorre a produção de beta lactamase pela bactéria (Gazagne, Delmas et al. 1998).

Desde os primeiros relatos de cepas de *H. influenzae* resistentes a ampicilina em 1974 nos EUA, o maior mecanismo de resistência antimicrobiana do *H. influenzae* foi considerado a produção de  $\beta$ -Lactamase TEM-1 ou ROB-1, realizada através de plasmídeos. A prevalência da produção de  $\beta$  – lactamase nas cepas aumentaram em 15,2% de 1983-1984 e 31,3% de 1997-1998 nos Estados Unidos. O *H. influenzae* não é apenas resistente a Ampicilina, ele também apresenta uma susceptibilidade reduzida a cefalosporina (Yamanaka, Hotomi et al. 2008). Logo, um aspecto de grande relevância a ser estudado no *H. influenzae* são os perfis de resistência à ampicilina, trimetropim, tetraciclina, cloranfenicol e sulfonamida, associados à presença de plasmídios produtores de  $\beta$ -lactamase (Dimopoulou, Kraak et al. 1992; Dimopoulou, Jordens et al. 1997; Leaves, Dimopoulou et al. 2000). Vários casos são relatados na literatura com relação a resistência a diversas classes de antibióticos por *H. influenzae* (Regelink, Dahan et al. 1999; Cerquetti, Giufre et al. 2007; Wang, Yu et al. 2008).

As opções terapêuticas para o tratamento de meningite por *H. influenzae* incluem: cloranfenicol em combinação com ampicilina e mais recentemente antibióticos cefalosporínicos e carbapenêmicos de terceira geração. (Cerquetti, Ciofi degli Atti et al. 2004) Durante um estudo realizado em Bangladesh, de acordo com Rahman et al, a taxa de resistência antimicrobiana de 52 cepas de *H. influenzae* b testadas foram: ampicilina 31%, cloranfenicol 42%, TMP-SMX 44%, azitromicina 1.4%. No geral, 44% das cepas de *H. influenzae* b apresentaram resistência a antibióticos (Rahman, Hossain et al. 2008).

O cloranfenicol é um antibiótico bem conhecido que exerce sua ação especificamente inibindo a síntese de proteína bacteriana, sem afetar um grande número de outros processos metabólicos (Jardetzky 1963). Sendo lipossolúvel, ele se difunde na bactéria pela sua membrana. Sua utilização na medicina contemporânea foi praticamente suspendida devido a sua dose dependência e supressão idiossincrática da medula, entretanto, é útil para certos tipos de infecção de risco de vida e em países subdesenvolvidos (Park, Kim et al. 2003). A barreira de permeabilidade ao cloranfenicol é o mecanismo de resistência mais reportado, Burns et al (1985) propuseram que o mecanismo de resistência ao cloranfenicol é a permeabilidade cromossomicamente mediada pelas cepas com relacionada com perda da proteína porina. (Burns, Mendelman et al. 1985)

Um estudo recente realizado por Manning et al. (2011) em Nova Guiné demonstrou que todas as cepas testadas de *H. influenzae* isoladas de crianças eram resistentes a cloranfenicol (Manning, Laman et al.). Outros estudos recentes demonstram essa mesma resistência das cepas de *H. influenzae* (Mandomando, Sigauque et al.), (Manning, Laman et al.; Bae, Lee et al. 2010). Sendo assim estudos com diversos genes responsáveis pelas resistências foram conduzidos levando a diferentes alvos. Um dos mais relevantes sendo o estudo das proteínas exteriores de membrana do *H. influenzae*, as porinas.

## Porinas - gene *ompP2*

Um razoável número de proteínas exteriores de membrana (*omp*) em *H. influenzae* foram estudadas, sendo que a maioria delas veio de isolados de *H. influenzae* tipo b que são usualmente examinados por eletroforese de gel de poliacrilamida em sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) (Barenkamp, Munson et al. 1981).

Quando analisadas, ambas as cepas, capsuladas e não capsuladas de *H. influenzae*, demonstraram componentes proteicos contendo até 36 proteínas, das quais 6 representam grande conteúdo proteico. Essas grandes proteínas têm peso molecular entre 50.000 e 15.000 daltons e são intituladas P1 a P6, na ordem decrescente de massa molecular. (Foxwell, Kyd et al. 1998).

Podemos observar na figura 1 a distribuição dessas porinas pela membrana externa do *H. influenzae*. A P1 é uma proteína com a superfície exposta, modificável pelo calor encontrada em *H. influenzae* tipo b e NTHi. Uma significativa variação primária na sequência da região P1 e sua habilidade de ser modificada pelo calor permite com que ela seja utilizada como uma forma de subtipagem de cepas de *H. influenzae* tipo b - Hib (Barenkamp, Munson et al. 1981).

A proteína P2 de diferentes cepas de Hib também foi estudada, e foi indicado que algum grau de heterogeneidade antigênica existe entre essa proteína de cepa para cepa. Essa proteína P2 localiza-se na superfície e funciona como uma porina em Hib, e também representa a proteína mais abundante na membrana externa desse patógeno (Murphy and Bartos 1988; Murphy and Bartos 1988). A proteína P4 é uma lipoproteína entre 28-30kDa que deve estar presente em todas as cepas capsuladas e não capsuladas de *H. influenzae* (Foxwell, Kyd et al. 1998).

De acordo com um estudo de Tokudu et al., foi sugerido que as moléculas de P2 e os antígenos de superfície, outros que não os de P2, estão envolvidos no desenvolvimento de defesa pulmonar

contra NTHi. Também sugere-se que pessoas previamente infectadas por NTHi continuem sendo susceptíveis à infecções por outras cepas de NTHi com diferentes epítomos (Koyama, Ahmed et al. 2007). A porina P2 de *H. influenzae* b demonstrou também induzir síntese de anticorpos no soro que protegem contra *H. influenzae* b em modelos animais (Hansen, Hasemann et al. 1989). Mudanças nas sequências de aminoácidos da forma única de formação da proteína porina de *H. influenzae* (*ompP2*; porina) foram associadas com aumento da resistência a antimicrobianos nas cepas de *H. influenzae* isoladas de pacientes com fibrose cística (Arbing, Hanrahan et al. 2002). Estudos realizados por Regelink et al. (1999) demonstraram que a porina de cepas resistentes a agentes antimicrobianos possuía um perfil de menor condutibilidade de corrente do que porinas isoladas de outras cepas, essa menor condutibilidade de corrente explicaria a menor susceptibilidade a antibióticos beta lactâmicos e também de baixo peso molecular, tornando-as resistentes (Regelink, Dahan et al. 1999). Sendo assim a Porina expressa pelo gene *ompP2* seria responsável pela resistência a antibióticos de baixo peso molecular, bem como um alvo para o sistema imune, como podemos ver sua representação na figura 1.

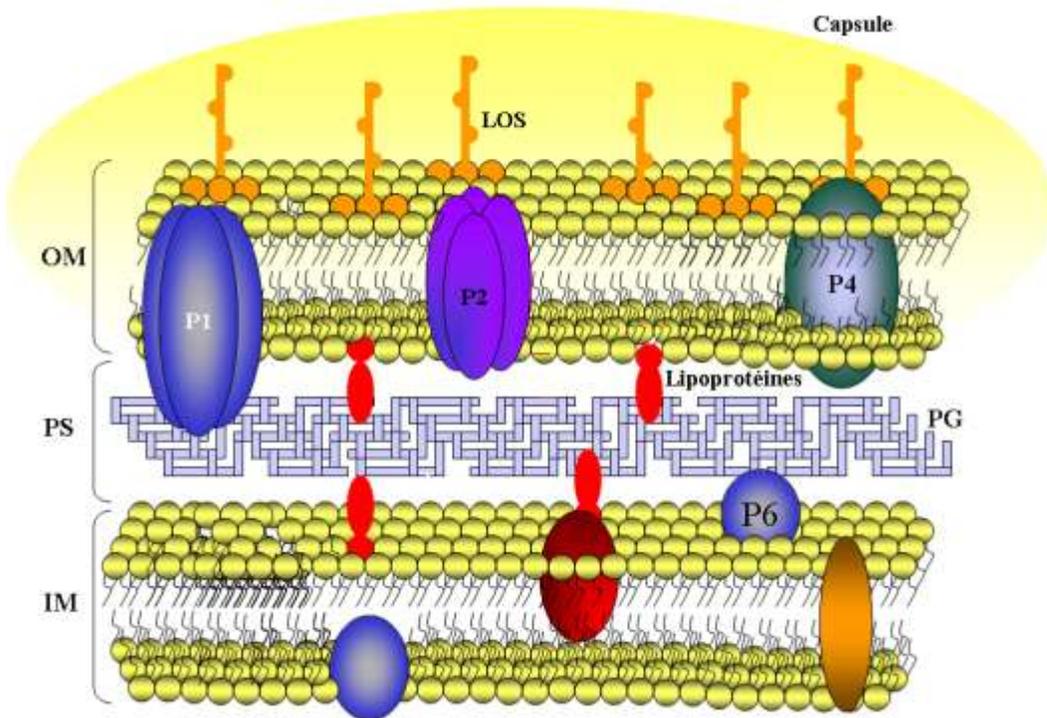


Figura 1 : Posicionamento das proteínas de membrana do tipo porina em *H. influenzae*. (Varela JN 2012) OM: membrana externa, PS: Espaço Periplasmático, IM: Membrana Interna. Capsule: cápsula. LOS: Lipooligosacarídeos. PG: Peptídeoglicano.

### Transferência Horizontal de genes

Muitas bactérias desenvolvem um estado físico chamado de competência natural, possibilitando as células para captação de DNA do meio ambiente e ocasionalmente recombinando o DNA com o seu cromossomo; a célula se diz transformada se as mudanças de recombinação mudam seu genótipo. A competência possui importantes implicações ecológicas e evolutivas para a bactéria: os nucleotídeos salvos da degradação do DNA providenciam nutrientes, e os alelos introduzidos pela transformação podem providenciar novidades genéticas e templates para reparo do DNA

celular (Maughan and Redfield 2009). Bactérias naturalmente competentes são capazes de captar DNA exógeno e possuem a capacidade de efetuar o processo de transformação. (Chen and Dubnau 2004) Células bacterianas naturalmente competentes se ligam a fragmentos de DNA de fita dupla na superfície celular, mas transportam somente fitas simples para o citoplasma (Mell, Shumilina et al.). Apesar de grande parte do DNA do meio ser degradado, ocasionalmente, um fragmento homólogo pode se recombinar com um cromossomo e deslocar uma fita residente (Maughan and Redfield 2009).

*Haemophilus influenzae* é naturalmente competente captando o DNA do ambiente a sua volta. O reconhecimento e a eficiência da captação de moléculas de DNA espécie - específica é mediada pela presença de sequências de sinais de captação (USSs) no DNA doador. A sequência consenso do USS no *H. influenzae* foi identificada como: 5\_-AAGTGCGGT-3\_ .(Takahata, Ida et al. 2007) . Em estudos prévios de competência de *H. influenzae* foi encontrado que ambas as quantias de DNA captadas e recombinadas varia extensivamente entre cepas distintas (Maughan and Redfield 2009).

## **Nanopartículas**

A Nanobiotecnologia é uma área da Nanotecnologia que envolve o uso de materiais de escala nanométrica no estudo e desenvolvimento de produtos biológicos como fármacos e vacinas. Sabe-se que nanoestruturas são utilizadas no estudo de microrganismos desde 2003 (Zhao 2003). O uso de nanomaterial orgânico e inorgânico atualmente se encontra em foco como ferramenta promissora para estudos sobre diversas áreas da biologia, como o tratamento e diagnóstico do câncer, atividade antimicrobiana (Zhao 2003) e alteração do processo de

transformação bacteriana(Hollanda, Cury et al.; Mattos, Alves et al.; Rojas-Chapana, Troszczyńska et al. 2005).

Recentemente, Hollanda *et al.* (2011), descreveu a influência de nanopartículas de sílica e carbono como adjuvantes em vacinas contra *N. meningitidis*. Tais estruturas atuam de modo a diminuir o escape vacinal do meningococo, um dos maiores problemas relacionados à vacinação contra este patógeno (Hollanda, Cury et al.).

Portanto, ao utilizarmos as nanopartículas podemos verificar se elas interagem de forma a facilitar o processo de transformação natural bacteriana, levando a uma possível modificação nas taxas de transformação bacteriana.

## 2 - OBJETIVOS:

Esse trabalho tem por objetivo:

- Analisar a transferência horizontal do gene *ompP2* de *Haemophilus influenzae* não tipado (NTHi) sorotipo 07 que apresenta resistência a cloranfenicol e tetraciclina para linhas selvagens, entre elas tipadas e não tipadas;
- Demonstrar que a aquisição de resistência entre os sorotipos de *H. influenzae*, transformando cepas não tipadas e tipadas em cepas resistentes a cloranfenicol é facilitado pela presença de nanopartículas de carbono (óxido de grafeno) para certas cepas;
- Verificar se ocorre um aumento da taxa de transformação quando tem-se a presença desses nanopartículas de óxido de grafeno no meio, mimetizando uma atmosfera árida;
- Verificar se ocorre um aumento na taxa de adesão a células A529 e Hec-1-B na presença de antibiótico comparando cepas selvagens e mutantes;
- Verificar a possibilidade de obtenção do gene *ompP2* por diversas cepas, levando a um possível alvo vacinal.

### **3 - Materiais e métodos**

#### **Meios de Cultura**

##### **Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar**

Foi utilizada a forma comercializada na concentração de 37 g/L pela Acumedia (Lansing, Michigan, USA). O material foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Para o preparo do BHI Ágar, adicionou-se 1,5 % de ágar ao meio de cultura líquido antes da esterilização pelo calor úmido (autoclave).

##### **Ágar Chocolate**

Após a esterilização de BHI Ágar, a uma temperatura de 80 °C, foi adicionado 5% de Sangue Desfibrilado de Cavalo.

##### **Suplemento de NAD e Hemina**

Foram usados suplementos NAD e Hemina (Sigma, Saint Louis, USA) conforme descrito abaixo:

- NAD: 0,2 mg/ml
- Hemina: 2 mg/ml

## Ágar Cholate Cloranfenicol

Após esterelizar o BHI Ágar a uma temperatura de 40°C foram adicionados 2µg por ml de uma solução de cloranfenicol (Sigma, Saint Louis, USA).

## Métodos

### Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento

Todas as linhagens de *Haemophilus influenzae* utilizadas no presente trabalho e suas origens estão descritas na tabela 1. Para as linhagens de *H. influenzae* foram cultivadas utilizando-se a técnica de esgotamento em ágar chocolate e/ou BHI suplementado com NAD e Hemina ágar à 37 °C à 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 18-24 horas. Para sua manutenção, as amostras foram suspensas em meio infusão de cérebro-coração (BHI) ao qual foi adicionado glicerol a 30 % e mantidas a -80 °C.

Tabela 2: Linhagens Utilizadas com Padrão e Linhagens Estudadas nesse Trabalho

Linhagens	Características	Origem
<b>Rd</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa padrão sequenciada completamente, do sorotipo d	INCQS – FIOCRUZ
<b>Hib-βlac</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo b ATCC	INCQS – FIOCRUZ
<b>Hi07</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> NTHi - CmR, TcR, ApR	LBMB
<b>Hi38</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo a isolado de um caso de pneumonia	LBMB
<b>Hi13</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> NTHi hmw+	LBMB
<b>Hi45</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo b isolado de uma hemocultura	LBMB
<b>Hi46</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo b isolado de uma	LBMB

	hemocultura	
<b>Hi47</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> NTHi isolado de uma hemocultura	LBMB
<b>Hic</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo c ATCC 9007 NCTC 8469.	IAL – SP
<b>Hie</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo e NCTC 10479.	IAL-SP
<b>Hif</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo f NCTC 7918.	IAL – SP

---

IAL – Instituto Adolfo Lutz SP, INCQS – FIOCRUZ – Instituto Nacional de Controle de Qualidade - Fundação Oswaldo Cruz.

LBMB – Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana – IB – UNICAMP

### **Cultivo Celular**

Células A549 (carcinoma epitelial pulmonar, obtido da coleção de linhagens do Instituto Adolfo Lutz) e células Hec-1b (carcinoma endotelial de uma endometriose humana, obtido da coleção de linhagens celulares do Instituto Adolfo Lutz) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10-20 % de Soro Fetal Bovino (SFB), dependendo da linhagem celular, e mantidas à 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a confluência da monocamada celular, as células foram tripsinizadas com tripsina (Cultilab-Campinas) e distribuídas em placas de 24 orifícios. A concentração celular obtida após a tripsinização era de 1.10<sup>6</sup> células/mL. Cada *well* recebeu uma alíquota de 1 mL da suspensão celular. As placas em questão foram incubadas sob as mesmas condições supracitadas até a confluência da monocamada celular.

### **Extração DNA Genômico**

#### **Solução de CTAB/NaCl**

Pesaram-se 8 g de brometo de cetramônio (Sigma Cat. No.H5882), 4,1 g de NaCl e estes foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada aquecida a 65 °C, sendo o volume completado para 100 mL.

### **Tampão Tris- EDTA pH 8,0 (TE pH 8,0)**

- Tris-HCl: 10 mM
- EDTA: 1,0 mM

### **Metodologia da Extração DNA Gênomico**

DNA genômico bacteriano foi isolado do crescimento de 18 horas de colônias de *H.influenzae* em ágar chocolate incubado a 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Uma suspensão bacteriana (Densidade ótica a 600nm = 2,00), em 400µL de tampão TE pH 8,0 (SAMBROOK *et al.*, 1989), foi adicionada a uma mistura de 70µL de 10% SDS e 5µL de Proteinase K a 10mg/ml. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 65 °C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65 °C de CTAB/NaCl (0,8g/L de brometo de cetramida e 0,4g/L de NaCl). Tal suspensão foi agitada até formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65 °C por mais 10 minutos. Foram adicionados 750µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (v/v) e a mistura agitada por cerca de 10 segundos. O material foi centrifugado a 12000 RPM, sendo o sobrenadante aquoso (600 µL) cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol -20°C. A mistura foi mantida à temperatura de -20°C por 30 minutos.

A solução foi centrifugada a 12000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi, por centrifugação, lavado duas vezes com solução de etanol 70% a -20°C. O DNA foi seco à temperatura ambiente e diluído com movimentos cuidadosos e circulares em 100 µL de água MiliQ esterilizada. A dosagem de DNA realizou-se como descrito por Sambrook *et al.* (1989), onde a concentração e pureza do DNA foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O ácido nucléico extraído foi conservado à temperatura de - 20°C.

### Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

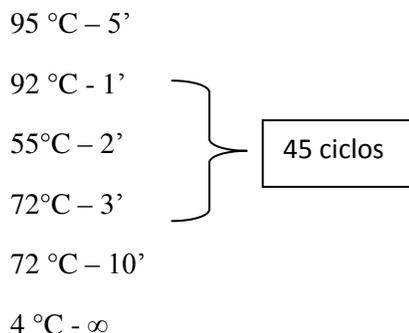
A sequencia do gene *ompP2* foi obtida através do GenBank GI:2981106 ([HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)). Para amplificação do gene *ompP2*, foi utilizado como DNA genômico da linhagem *H. influenzae* NTHi 07 como DNA molde, utilizando os *primers* inicializadores presentes na tabela 3.

**Tabela 3** - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no trabalho

Primer	Sequência de nucleotídios 5'- 3'	Descrição
PorHi Fw	ATTAATCGTTGGTGCATTTCG	<i>porHi forward</i>
Por Hi Rev	GAAGTAAACGCGTAAACCTACAC	<i>porHi reverse</i>

Para um volume final de 50 µL de mistura de reação, contendo as especificações do fabricante da enzima *Taq* DNA Polimerase, foi adicionado 50 moles de cada oligonucleotídeo, 2 µL do DNA *template*, solução tamponante da reação 10X na concentração final 1X acrescido de cloreto de magnésio 2mM e 2,5U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). Posteriormente, o tubo

foi submetido à amplificação em termociclador (Gene Amp PCR System 9700), utilizando o seguinte ciclo:



A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose (1,5%) contendo brometo de etídeo (0,05%). Como pré-corrída, aplicou-se, inicialmente, uma voltagem de 20V, até que todo o corante azul penetrasse no gel. Após este procedimento, a voltagem foi aumentada para 100V até que o marcador alcançasse a extremidade oposta do gel. Após o término da corrida, a visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e o tamanho dos fragmentos foi determinado com o uso do *Software Kodak ID*, tendo-se como padrão de peso molecular o 1kb *DNA-ladder*. Após este procedimento, o gel foi fotografado pelo sistema *GelDoc It – Imaging System*, com filtro vermelho utilizando-se o *software VisionWorks* ®LS.

## **Transferência de genes**

### **Processo de transformação**

Os nanopartículas de carbono utilizados nesse trabalho foram produzidos no laboratório de Nano engenharia e Diamante (NanoEng) do Departamento de semicondutores , instrumentos e fotônica

da Faculdade de Engenharia Elétrica e de ciências da Computação da Unicamp. Conforme podemos observar nas fotos da figura 2.

As bactérias crescidas foram transferidas com a utilização de uma alça estéril para o meio BHI caldo suplementado com 2 µg/mL de NAD de 10µg/mL de hemina para o *H. Influenzae*, numa concentração final de 1.0 de densidade óptica em um tubo eppendorf de 1,5 mL. A transformação foi realizada usando 100µL da solução bacteriana sendo incubada com 5µL de amplicon numa concentração de 1µg/ml seguida pela colocação de 15µL de nanopartículas de carbono na concentração de 20µg/ml por 30 min. Posteriormente 1000µL de meio caldo BHI suplementado para *H. Influenzae* foi adicionado e a bactéria foi encubada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 3h. Depois, 100µL da alíquota foi transferida para placas de BHI agar com a concentração de 2µg/ml de cloranfenicol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e foram crescidas por 18h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os controles negativos foram realizados sem a utilização de nanopartículas de carbono no procedimento.

O número de UFC foi verificado e a análise estatística foi realizada comparando o número de transformantes obtidos com e sem o uso de nanopartículas de carbono. A verificação da aquisição do gene foi realizada por PCR nas mesmas condições de obtenção da amostra.

### **Teste de concentração inibitória mínima - (CIM)**

Esse teste foi realizado conforme descrito por Benfatti e al. (Benfatti 2010), com metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em multiplaca de 96 cavidades. As bactérias foram crescidas por 18h em estufa a 37°C com 5%CO<sub>2</sub>, uma solução bacteriana com densidade ótica

em 600nm de 1,25 foi utilizada. A placa de 96 cavidades foi preenchida com 100µl de meio de cultura em caldo BHI com Hemina (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e Nicotinamida (Sigma, Saint Louis, MO, USA), após o preenchimento com o meio a solução bacteriana foi adicionada aos poços, seguida pelo antibiótico diluído em meio de cultura para uma concentração inicial de 32µg/ml. Foram realizadas fileiras de controle positivo, somente com meio e a bactéria e controle negativo, somente o meio de cultura. As placas foram incubadas por 24h 37°C com 5%CO<sub>2</sub>, e lidas em espectrofotômetro a 590nm.

## **Ensaio de citotoxicidade**

### **Soluções Utilizadas**

#### **Solução Salina Tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4**

Solução utilizada para lavagem da cultura celular no seu preparo e manutenção

- NaCl : 8,0g
- KCl : 0,20g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,12g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anidro) : 0,91g
- H<sub>2</sub>O destilada : 1000ml

#### **Corante Vermelho Neutro**

A solução estoque de vermelho neutro (2-amino-3-metil-aminofenozoniumcloro) foi diluída a 0,4% em água deionizada estéril, centrifugando a 2500Xg por 3 minutos e filtrada para remoção

de precipitados do corante. Um dia antes do uso a solução foi diluída na razão 1:80 em meio essencial mínimo RPMI 1640.

### **Solução Formol - cálcio**

Utilizada para fixar as células coradas pelo vermelho neutro, nos ensaios de determinação de viabilidade celular.

- Formaldeído 40% : 10ml
- CaCl<sub>2</sub> 10%: 10ml
- H<sub>2</sub>O deionizada: 10ml

### **Solução Etanol- Ácido Acético**

Utilizada para liberar o vermelho neutro das células viáveis que captarem o corante para determinação da viabilidade celular.

- Ácido Acético Glacial : 1,0 ml
- Etanol 50% : 100 ml

### **Ensaio de Citotoxicidade**

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Konowalchuk et al 1977 (Konowalchuk 1977). Após a formação da monocamada celular o meio foi retirado e substituído por 0,1ml (100µL) de meio RPMI 1640 +1% de Soro fetal Bovino, em todos os poços, exceto pelas fileiras de teste do composto. Dilui-se os compostos em RPMI1640 e Soro Fetal Bovino e foi realizada a

diluição da concentração inicial de 4µg/ml, sendo diluído pela metade cada passagem. A placa foi incubada em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C.

### **Determinação da Viabilidade Celular**

O teste de viabilidade celular por coloração com vermelho neutro foi realizado como descrito por Borenfreund e Borrero (Borenfreund and Borrero 1984). Após 24hs de incubação, o meio de cultura celular foi removido e as células lavadas com solução salina tamponada pH 7,4. Para cada poço foi inserida uma solução de 0,2ml de RPMI 1640 contendo 50µg/ml do corante vermelho neutro e a placa incubada por 3h a 37°C, para captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Após a incubação, o meio contendo corante foi removido e os poços lavados rapidamente com a solução de formol-cálcio para remoção do corante não incorporado pelas células. Finalmente 0,2 ml (200µL) de solução etanol-ácido acético foram adicionados a cada poço e a placa foi mantida por 15 minutos a temperatura ambiente para remoção do corante das células viáveis. O corante foi quantificado em espectrofotômetro a 540nm. Os 2 poços na primeira coluna receberam meio sem o corante para servir como branco. Como controle as 3 primeiras fileiras não receberam o composto cloranfenicol. A viabilidade celular foi determinada por comparação dos valores de absorbância obtidos por poços controles (sem o composto teste), os quais foram considerados com 100% de viabilidade celular.

## **Ensaio de Adesão**

O teste de adesão em células foi baseado na metodologia descrita por Scaletsky et al. (Scaletsky, Silva et al. 1984). Para a realização do mesmo, 50 µL de uma suspensão bacteriana contendo 1.106 unidades formadoras de colônia (UFC) foi adicionada a cada poço contendo 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e 2µg/mL de cloranfenicol em poços distintos dependendo da cepa bacteriana. Para determinar a quantidade de UFC de *H. influenzae* utilizadas em cada teste de adesão, um volume também de 50 µL foi plaqueado em placas de ágar chocolate e incubadas a 37 °C por 16-18 horas. A placa teste de células e bactérias foi incubada a 37 °C por 3 horas e esta foi encaminhada a análise de percentual de adesão.

### **Caracterização do percentual de adesão de *Haemophilus influenzae* em monoculturas celulares**

O percentual de adesão de diferentes linhagens de *Haemophilus* nas linhagens celulares A549 e Hec-1-B foi obtido através da seguinte metodologia.

Infectou-se a monocamada celular com *H. influenzae* mutantes e selvagens por 3 horas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Descartou-se o meio celular após esse tempo e lavou-se as placas de 24 poços com as células por 5 vezes com RPMI 1640, seguida do descarte do meio celular novamente - a lavagem da placa contendo a cultura celular após o período de infecção foi realizada a fim de eliminar as bactérias que não aderiram as células. Adicionou-se 1 mL de RPMI 1640 a cada poço e raspou-se com uma ponteira de micropipeta cada poço. Uma alíquota de 50µL foi recolhida de cada poço e plaqueada em meio ágar chocolate com cloranfenicol para linhagens mutantes e sem

cloranfenicol para as linhagens selvagens. As placas foram incubadas por 16-18h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Foi realizado a contagem das UFC nas placas de ágar chocolate com e sem cloranfenicol.

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad InStat: para a taxa de transformação foi feito o teste de Bonferroni, entre o número de UFC e as cepas transformadas com e sem as nanopartículas de óxido de grafeno. E para o teste de adesão foi utilizado o teste de Tukey. As taxas de transformação foram considerados valores de  $p < 0,05$ . O teste de adesão foi comparado com uma amostra controle. Todos os experimentos foram feitos em triplicada.

## **4 - Resultados e Discussão**

### **Amplificação do gene *ompP2***

O gene *ompP2* foi amplificado nas condições mencionadas em metodologia. O seu amplicon foi obtido na faixa de 800 pb e utilizado diretamente nos experimentos de transformação. Logo, como o DNA estava em alta concentração, devido ao procedimento de PCR, foi possível apresentar para as células bacterianas uma alta concentração de material genético.

### **Óxido de grafeno**

O nano-material utilizado no processo de transformação tem sua estrutura representada na figura 2. Como podemos observar nas fotos de Microscopia eletrônica de varredura, em diversos aumentos, sua forma é em folhas e fragmentada, podendo ter sua estrutura comparada com a do material genético.

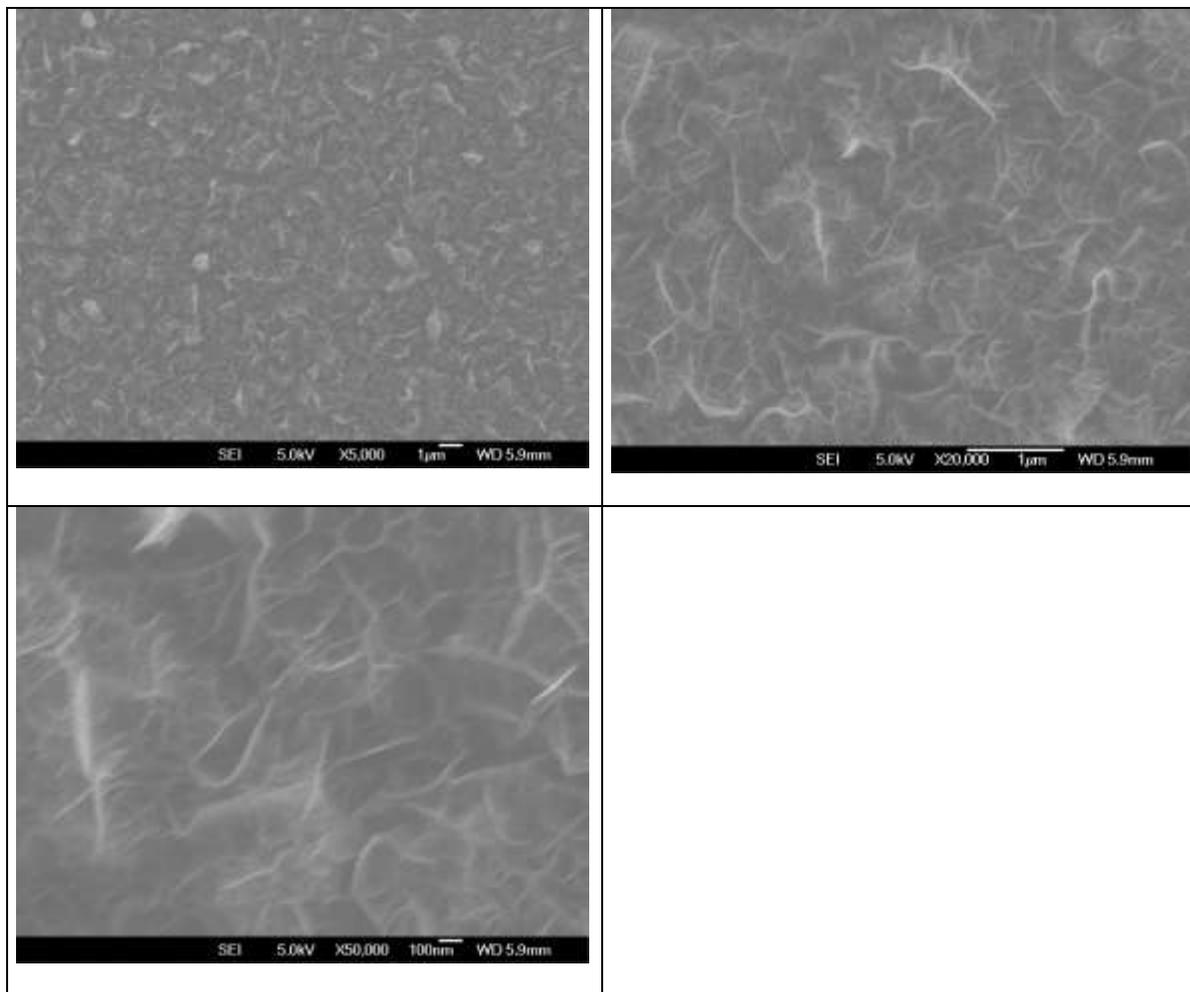


Figura 2: Fotos de MEV em diferentes ampliações da mesma amostra, de óxido de grafeno, nanopartícula utilizada nesse trabalho.

### Taxa de transformação com e sem óxido de grafeno (OG)

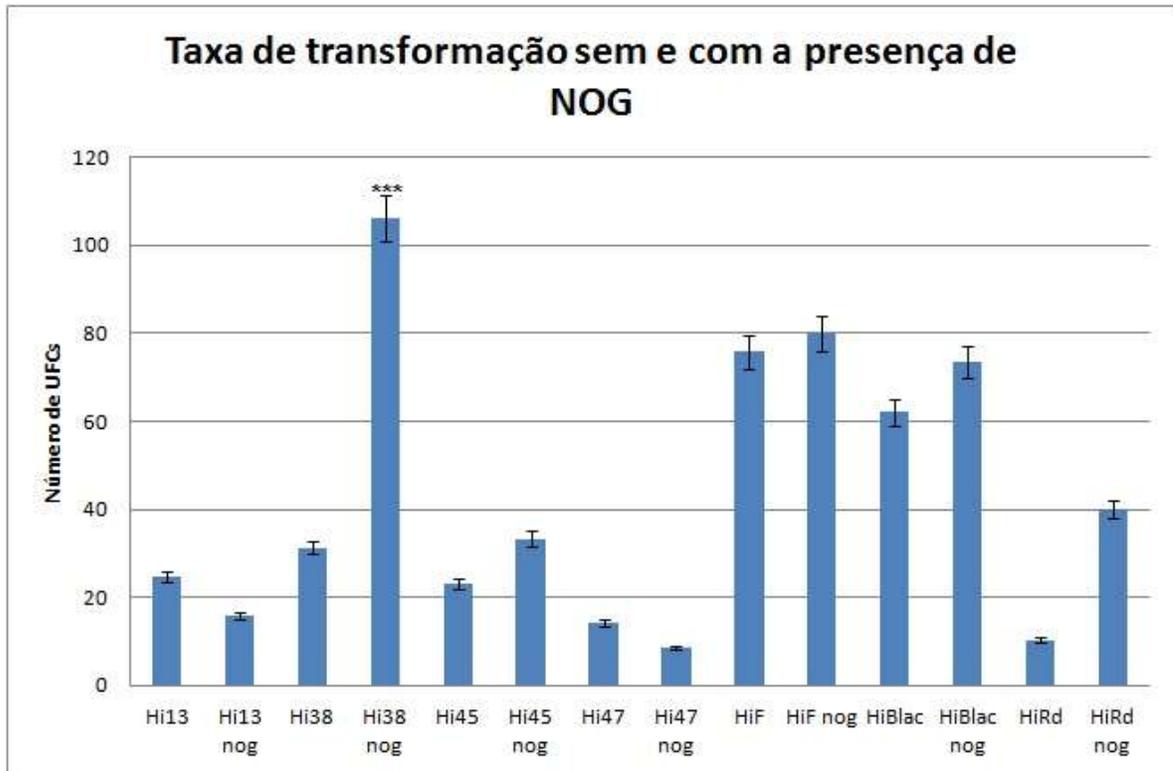


Figura 3: Gráfico de taxa de transformação das linhagens de *H. influenzae* sem e com a presença de NOG. Somente a linhagem *H. influenzae* 38 apresentou um valor de p significativo de  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

Antes de realizar os testes com a utilização das nanopartículas de óxido de grafeno, todas as linhagens passaram previamente por um triagem, demonstrando sua capacidade de transformação. A taxa de transformação das linhagens variou com e sem a presença de nanopartículas de óxido de grafeno, conforme podemos observar na figura 3. O uso de nanoestruturas para verificar se um melhoramento da taxa de transformação é obtido já foi realizado em trabalhos prévios do grupo, como Holanda et al (2011) e Mattos et al (2011), comprovando uma melhora na taxa de transformação na presença das mesmas (Holanda, Cury et

al.; Mattos, Alves et al.). O nano-material, devido sua similaridade estrutural, pode ter se complexado com a DNase bacteriana, evitando assim com que ocorresse uma degradação do material genético exógeno ao da bactéria. A entrada desse DNA exógeno, não próprio da bactéria pode ter sido então facilitada pela presença das nanopartículas. A concentração aproximada de nanopartículas do meio era 40µg/µl e a concentração aproximada de DNA era 35µg/µl, praticamente 1:1. Em uma atmosfera árida é esperada que essa concentração seja superior, entretanto no caso desse trabalho o tempo de incubação da transformação foi o mais crítico, sendo de 30 minutos, como pré-estabelecido em trabalhos prévios do grupo com bactérias gram negativas. É importante também salientar que como a bactéria é gram negativa a quantidade de DNase no meio próximo a mesma é menor do que a quantidade secretada por uma bactéria gram positiva. Já que, também temos a presença dessa enzima no espaço periplasmático da bactéria gram negativa.

De acordo com Mattos et al, os resultados de inibição da ação da DNase sobre DNA livre poderiam ser explicados pela possível proteção que as nanopartículas de óxido de grafeno conferem ao DNA livre quando esse entra em contato com elas. O uso dessas nanopartículas poderia mimetizar a presença de partículas de carbono na atmosfera como no caso da poluição, facilitando o processo de transformação e evocando surtos como a febre púrpura brasileira causada por um outro biogrupo de *H. influenzae* também naturalmente competente (Mattos, Alves et al.). O *H. influenzae* biogrupo *aegyptius* é o causador de febre púrpura brasileira - uma doença inflamatória perigosa com alta taxa de mortalidade associada (Kroll, Wilks et al. 1998). Kroll et al (1998) descreveram essas cepas de *H. influenzae*, usualmente associadas com casos de conjutivite como um produto de transferência horizontal entre *Neisseria meningitidis* e *H. influenzae* (Kroll, Wilks et al. 1998). Na mesma região geográfica desses surto, a prática de

agricultura primitiva, feita queimando-se a cana de açúcar, gera uma emissão de micro e nanopartículas de carbono na atmosfera, provocando desordens respiratórias pela inalação dessas partículas (Ribeiro 2002).

A única linhagem que apresentou um  $p$  significativo ( $p < 0,001$ ) foi a *H. influenzae* 38. Uma característica particular que distingue essa cepa das outras é o fato dela ter sido isolada de uma amostra de pneumonia - tabela 2 - uma bactéria usualmente mais adaptada a uma atmosfera com presença de partículas suspensas poderia possuir uma maior adaptabilidade para utilizar essas partículas de forma favorável. Provavelmente essa cepa utilizou essas partículas para inibir a ação da DNase, como proposto por Mattos et al. 2011. Portanto, uma cepa isolada de uma pneumonia poderia ser mais bem adaptada com relação ao uso de nanoestruturas do que uma cepa isolada de uma hemocultura, a cepa 38 pode ter sofrido a ação dessas nanopartículas previamente e as utilizado de forma vantajosa para adquirir fragmentos de DNA que permitissem sua melhor adaptabilidade. Essa característica pode ter permanecido em sua habilidade de competência frente a atmosferas poluídas. Logo, quando colocada em contato com os nanoestruturas de óxido de grafeno, a mesma conseguiu apresentar uma maior taxa de transformação.

Durante o processo natural de transformação, no qual o DNA exógeno troca de lugar com os segmentos de cromossomos da bactéria, o processo é limitado pelo tamanho e tipo da sequência entre os dois materiais genéticos. Relacionando as linhagens bacterianas permitindo que patógenos compartilhem: resistência a antibióticos, determinantes antigênicos e fatores de virulência (Mell, Shumilina et al.). Com relação as outras cepas de *H. influenzae* nenhuma apresentou um  $p$  significativo no teste de Tukey, ou seja não houve nenhuma outra linhagem

com a quantidade de transformantes aumentada com a presença de nanopartículas de óxido de grafeno, entretanto, essas outras cepas vieram de hemoculturas e coleções.

Observando-se o gráfico da figura 3, podemos inferir que a ação de nanopartículas da atmosfera obtida de atividades como agricultura primitiva e poluição podem influenciar no processo de transformação de bactérias naturalmente competentes, fazendo com que ocorra um aumento no número de transformantes a partir da utilização das mesmas no ambiente. Em trabalhos futuros serão realizados testes com aumento na concentração de nanopartículas para verificar se ocorreria uma melhora no processo de transformação se a concentração fosse aumentada para uma proporção de 1:2 (DNA : Nanopartículas), ou se a questão de aumento remete somente a cepa utilizada e de qual coleção pertence ou amostra foi isolada.

### **Verificação da incorporação do gene *ompP2***

A verificação da aquisição do gene de resistência *ompP2* foi feita através de PCR. Observou-se a presença da Porina em ambas as amostras de *H. influenzae* transformadas com e sem as nanopartículas de óxido de grafeno.

### **Citotoxicidade**

Testou-se o antibiótico cloranfenicol em linhagens celulares de A549 e Hec1B para verificar sua citotoxicidade, a fim de averiguar se não ocorreria nenhuma morte celular causada pelo mesmo. Uma vez que isso poderia vir a interferir com os testes de adesão quando o antibiótico estivesse presente no meio de cultura, garantindo que o mesmo somente interagisse com as bactérias e não com as linhagens celulares. Os gráficos (figura 4 e figura 5) demonstram

a viabilidade celular conforme a concentração de cloranfenicol no meio. Pode-se observar que a maior concentração utilizada somente levou a uma diminuição da viabilidade celular em 20% para A549 e Hec1B. Mostrando-se não tóxico nas concentrações utilizadas para o teste de adesão (2µg/ml) , no caso com 83% de viabilidade celular.

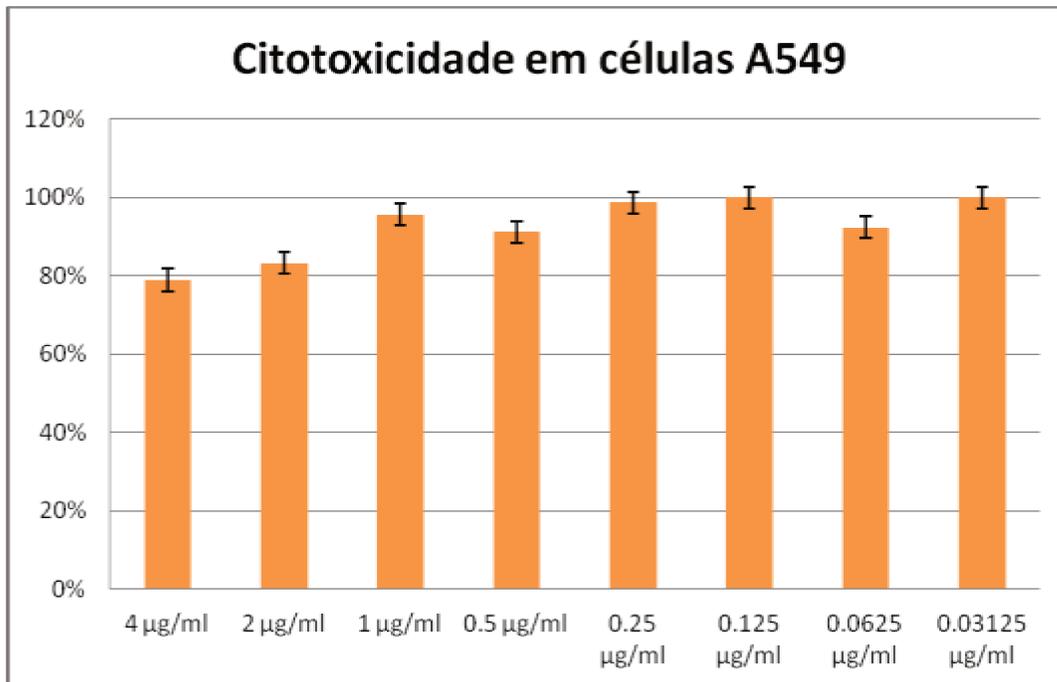


Figura 4: Gráfico da viabilidade celular pela concentração do antibiótico cloranfenicol nas concentrações de 4µg/ml a 0.03125µg/ml.

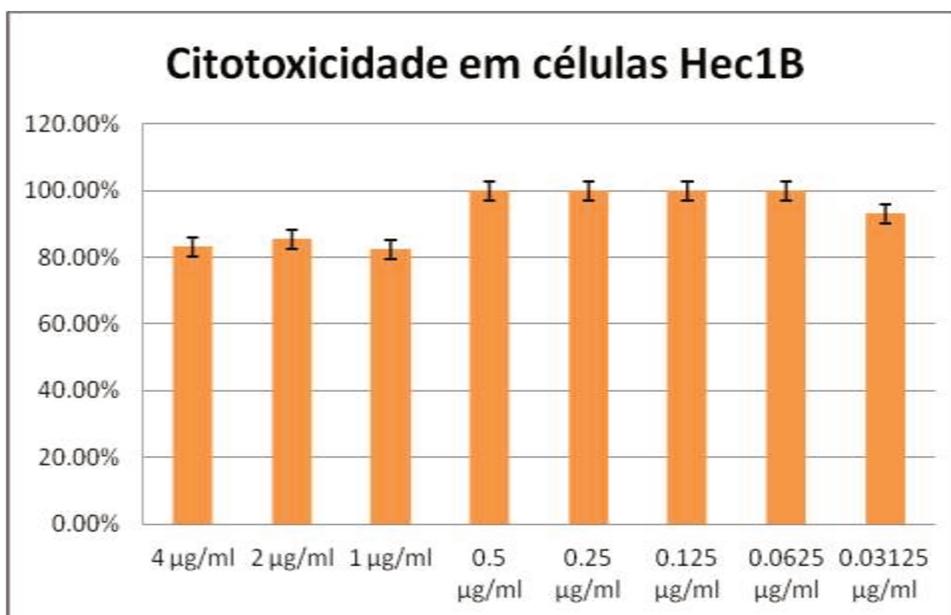


Figura 5: Gráfico da viabilidade celular pela concentração do antibiótico cloranfenicol nas concentrações de 4µg/ml a 0.03125µg/ml.

### Concentração inibitória mínima - CIM

As linhagens transformadas e as linhagens selvagens passaram por um teste de CIM para verificar sua susceptibilidade a antibióticos.

Tabela 4: Teste de concentração inibitória mínima - CIM das linhagens bacterianas mutadas e selvagens.

Linhagem bacteriana	Concentração inibitória mínima-CIM (µg/ml)
<i>H. influenzae</i> 07	32
<i>H. influenzae</i> 13	2
<i>H. influenzae</i> 45	16
<i>H. influenzae</i> 46	8

<i>H. influenzae</i> 47	2
<i>H. influenzae</i> C	2
<i>H. influenzae</i> E	2
<i>H. influenzae</i> F	2
<i>H. influenzae</i> Rd	2
<i>H. influenzae</i> $\beta$ lac	4
<i>H. influenzae</i> 13M	16
<i>H. influenzae</i> 38M	16
<i>H. influenzae</i> 45M	8
<i>H. influenzae</i> 46M	16
<i>H. influenzae</i> 47M	16
<i>H. influenzae</i> CM	8
<i>H. influenzae</i> EM	16
<i>H. influenzae</i> FM	8
<i>H. influenzae</i> RdM	16
<i>H. influenzae</i> $\beta$ lacM	32

---

De acordo com as normas de desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) a susceptibilidade para *H. influenzae* enquadra-se como susceptível menor ou igual a 2 $\mu$ g/ml, intermediário igual a 4 $\mu$ g/ml, e resistente a maior ou igual a 8 $\mu$ g/ml (Wilder 2005). As linhagens selvagens apresentaram uma susceptibilidade maior ao cloranfenicol com uma concentração inibitória mínima de 2  $\mu$ g/ml para todas, exceto pelas linhagens 45 e 46 que se apresentaram resistentes, com uma CIM de 16 e 8  $\mu$ g/ml respectivamente que se enquadrariam como resistentes. Já as linhagens mutadas apresentaram-se todas resistentes ao antibiótico como esperado, e tiveram sua resistência aumentada, como a 46 de 8 para 16  $\mu$ g/ml. Demonstrando que a aquisição do gene *ompP2* foi

efetiva e importante para adquirir essa resistência. A linhagem 38 selvagem não apresentou crescimento significativo para realização do teste em tempo hábil, em estudos futuros a mesma terá sua CIM testada.

### **Taxa de adesão Bacteriana em linhagens celulares de A549 e Hec1B com e sem a presença de cloranfenicol**

Algumas linhagens mutantes de *H. influenzae* foram escolhidas para verificar se a adesão das mesmas em linhagens celulares humanas era maior ou menor devido a mutação com o gene *ompP2* com e sem a presença de cloranfenicol. As linhagens de *H. influenzae* escolhidas foram: 13 (NTHi), 46 (b), 47 (NTHi), C (c) e  $\beta$ lac (b). Destas somente a linhagem 46 já apresentava uma resistência ao cloranfenicol, que foi aumentada com a presença do gene.

O teste de adesão foi proposto porque a aderência é considerada como um fator importante para manutenção da bactéria na superfície da mucosa do organismo hospedeiro (Scaletsky, Silva et al. 1984), através dele podemos verificar se linhagens mutantes seriam capazes de aderir mais do que as linhagens selvagens sem e com a presença do antibiótico no meio de cultura celular, observando-se também se aquisição do gene *ompP2* de *H. influenzae* cepa 07 modificaria esse perfil. A linhagem celular de A549 foi escolhida pela predileção do *H. influenzae* pelo trato respiratório, ela é uma linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar, formando uma monocamada confluenta com características morfológicas e coloração de ácido tânico de corpos lamelares (Foster, Oster et al. 1998), enquanto as células de Hec1B são de adenocarcinoma de endométrio (Spence and Clark 2000), mimetizando um endotélio.

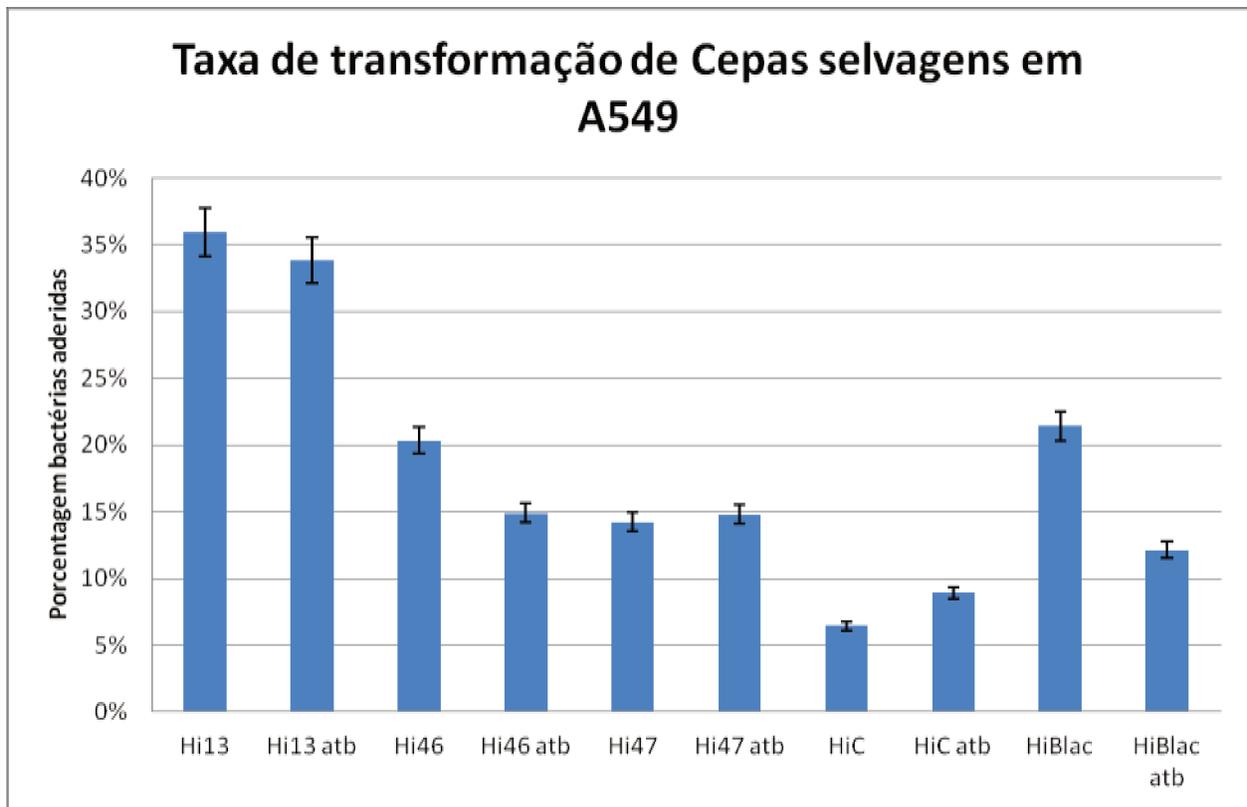


Figura 6: Gráfico com a taxa de adesão de cepas selvagens em linhagens celulares A549, com e sem a presença de cloranfenicol no meio de cultura, nenhuma linhagem apresentou um valor de p significativo. Atb= antibiótico.

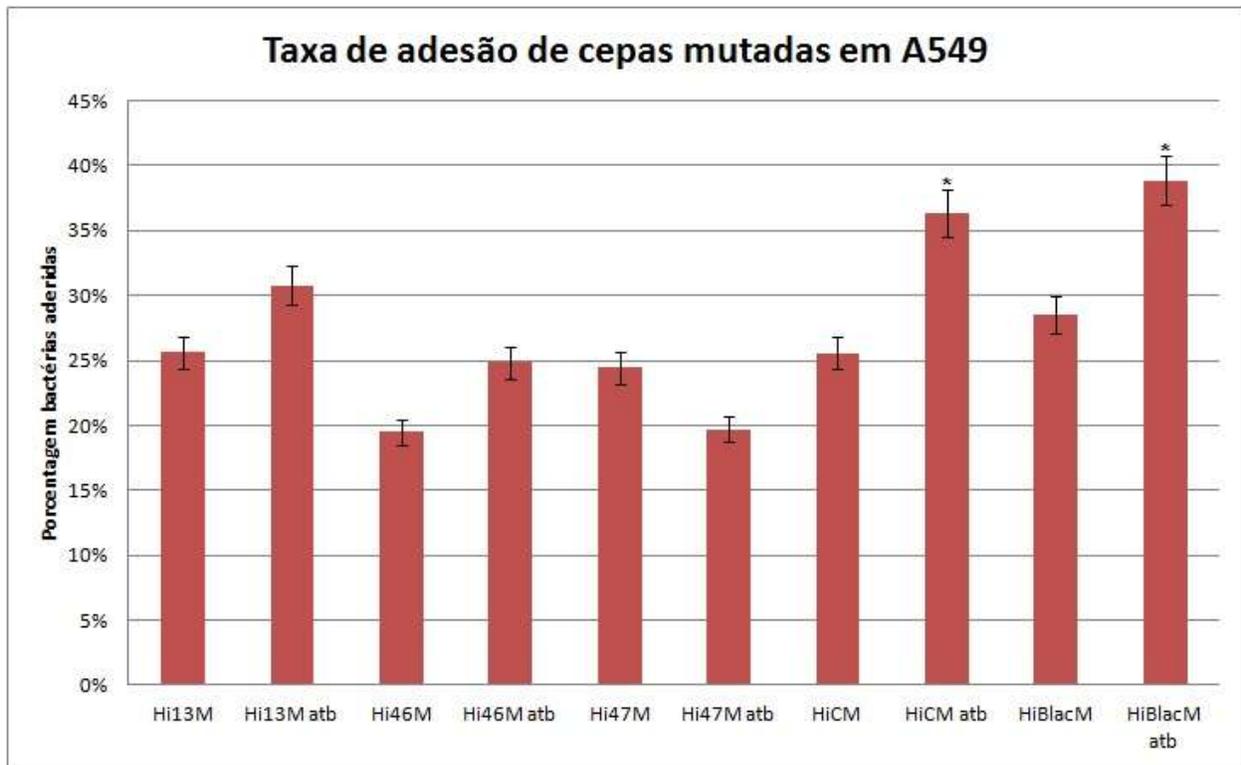


Figura 7: Gráfico da taxa de adesão em cepas mutadas de *H. influenzae* em linhagens celulares de A549, com e sem cloranfenicol no meio de cultura. As linhagens HiCM atb e Hiβlac atb apresentaram um p significativo de  $p < 0,05$  (\*), quando comparadas com sua adesão sem antibiótico no meio celular. M= Mutada, atb=antibiótico.

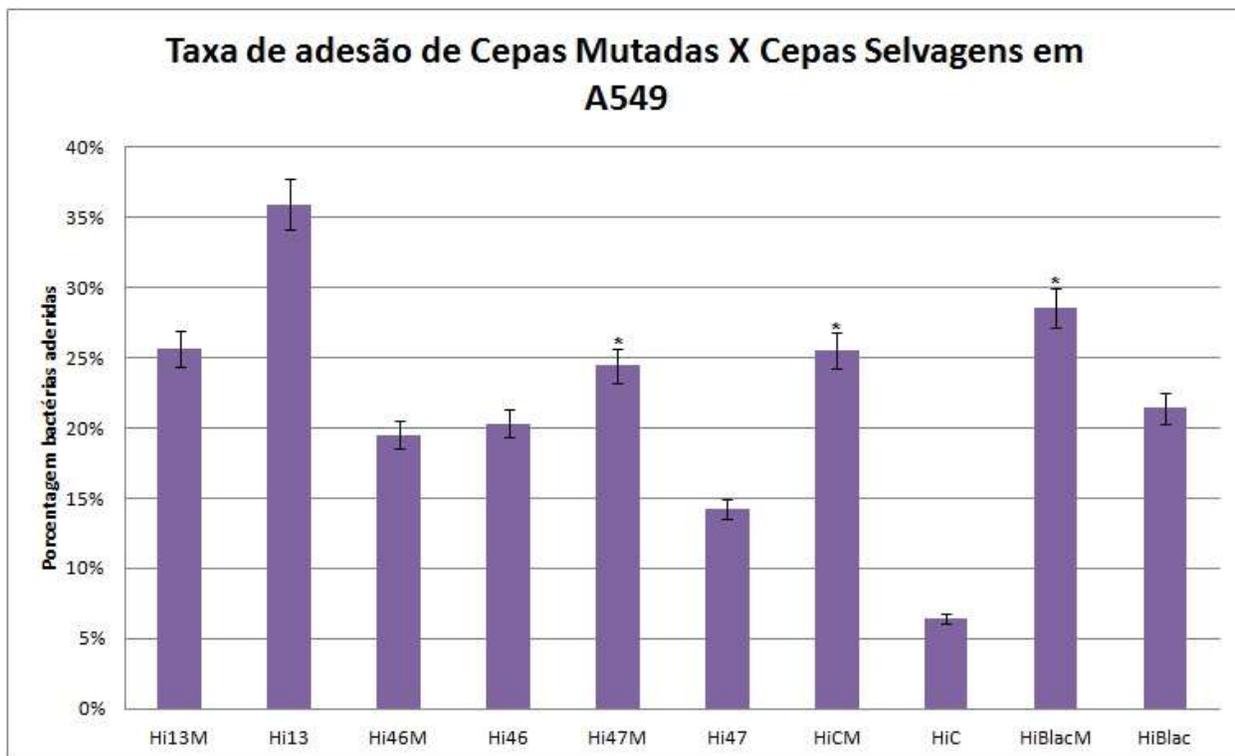


Figura 8: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas comparadas com cepas selvagens em linhagens celulares de A549 sem a presença de antibiótico no meio. As linhagens mutadas 47, C e βlac apresentaram um maior percentual de adesão com um p significativo de  $p < 0,05$  (\*). M= mutada.

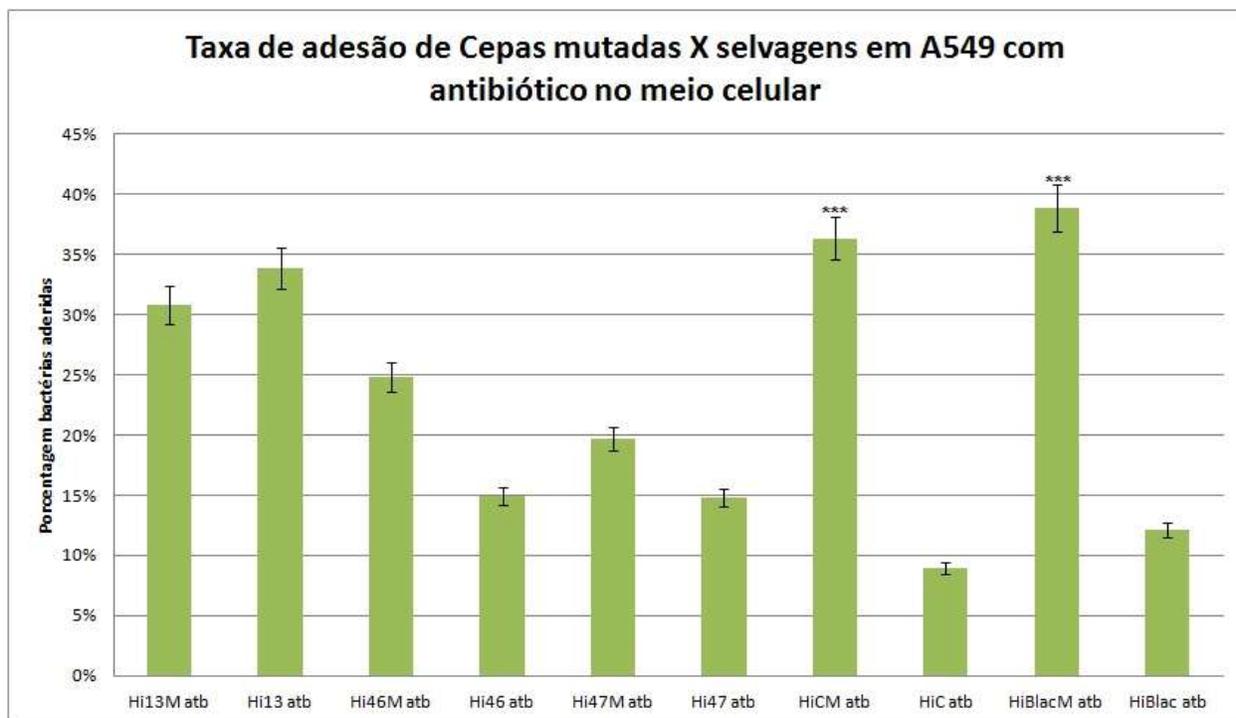


Figura 9: Gráfico da taxa de Adesão de cepas mutadas comparadas com cepas selvagens em linhagens celulares de A549 com a presença de antibiótico no meio. As linhagens mutadas HiC e Hiβlac tiveram um maior percentual de adesão, apresentando um p significativo,  $p < 0,001$  (\*\*\*). M= mutada, atb= antibiótico.

As linhagens de *H. influenzae* selvagens não apresentaram valores estatisticamente significativos de diferença na taxa de adesão em linhagens celulares de A549 quando realizado o experimento com e sem o antibiótico no meio de cultura (figura 6), enquanto as linhagens mutadas de *H. influenzae* em linhagens celulares A549, apresentaram um aumento na taxa de adesão com um p significativo,  $p < 0,05$ , para as linhagens mutadas C e βlac (figura 7), quando houve a presença de antibiótico no meio de cultura. Ao compararmos as linhagens selvagens com as mutadas sem a presença de antibiótico no meio de cultura podemos perceber que as linhagens mutadas

apresentaram um aumento na taxa de adesão quando comparadas com as selvagens, as linhagens de *H. influenzae* 47, C e  $\beta$ lac mutada apresentaram um p significativo,  $p < 0,05$ , (figura 8). E o mesmo comportamento é observado quando temos cloranfenicol no meio de cultura, as linhagens mutadas C e  $\beta$ lac apresentaram p significativo também,  $p < 0,001$ , (figura 9), ao serem comparadas com as selvagens com antibiótico no meio de cultura. O antibiótico no meio de cultura provavelmente atua diminuindo o crescimento bacteriano em linhagens selvagens, enquanto pode vir a aumentar a expressão do gene *ompP2* em linhagens mutadas. Sendo assim é esperado uma diminuição na porcentagem de adesão bacteriana com a presença do antibiótico, uma vez que o mesmo inibe o crescimento da bactéria e conseqüentemente sua adesão à célula.

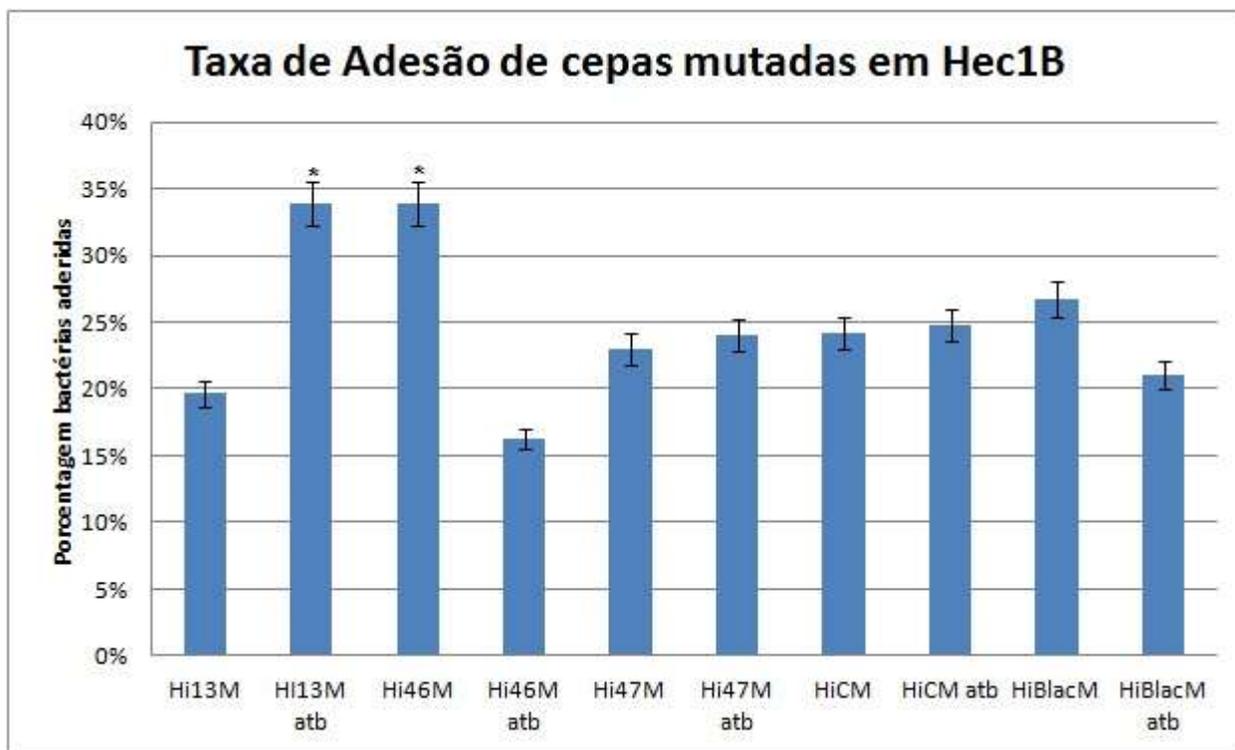


Figura 10: Taxa de adesão de cepas mutadas em Hec1B sem e com a presença de antibiótico (atb) no meio de cultura da linhagem celular. A linhagem de HI13Matb apresentou um valor de

$p < 0,05$  (\*), enquanto a linhagem de Hi46M apresentou um valor de  $p < 0,05$  (\*), quando estava em um meio sem antibiótico. M= mutada, atb= antibiótico.

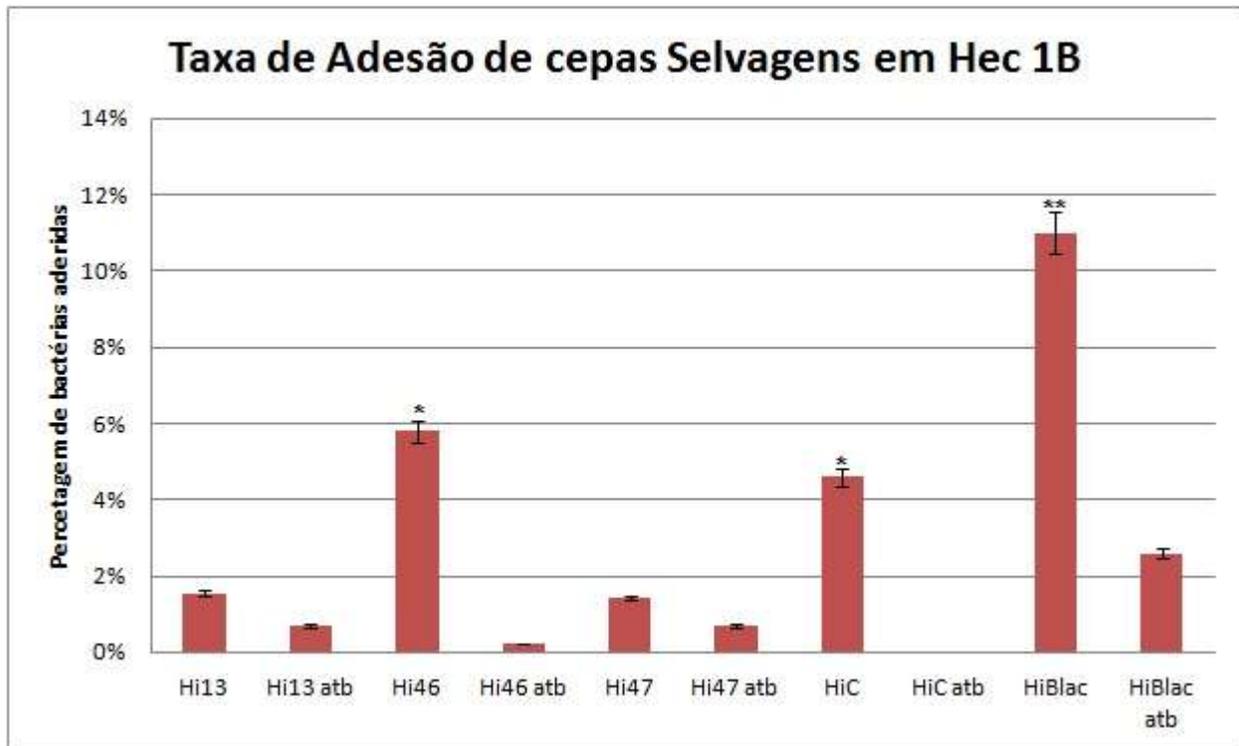


Figura 11: Taxa de Adesão de cepas selvagens em A549 sem e com a presença de antibiótico (atb) no meio de cultura da linhagem celular. As linhagens de *H. influenzae* 46, C e  $\beta$ lac selvagens sem a presença de antibiótico no meio apresentaram um valor de p significativo,  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*).

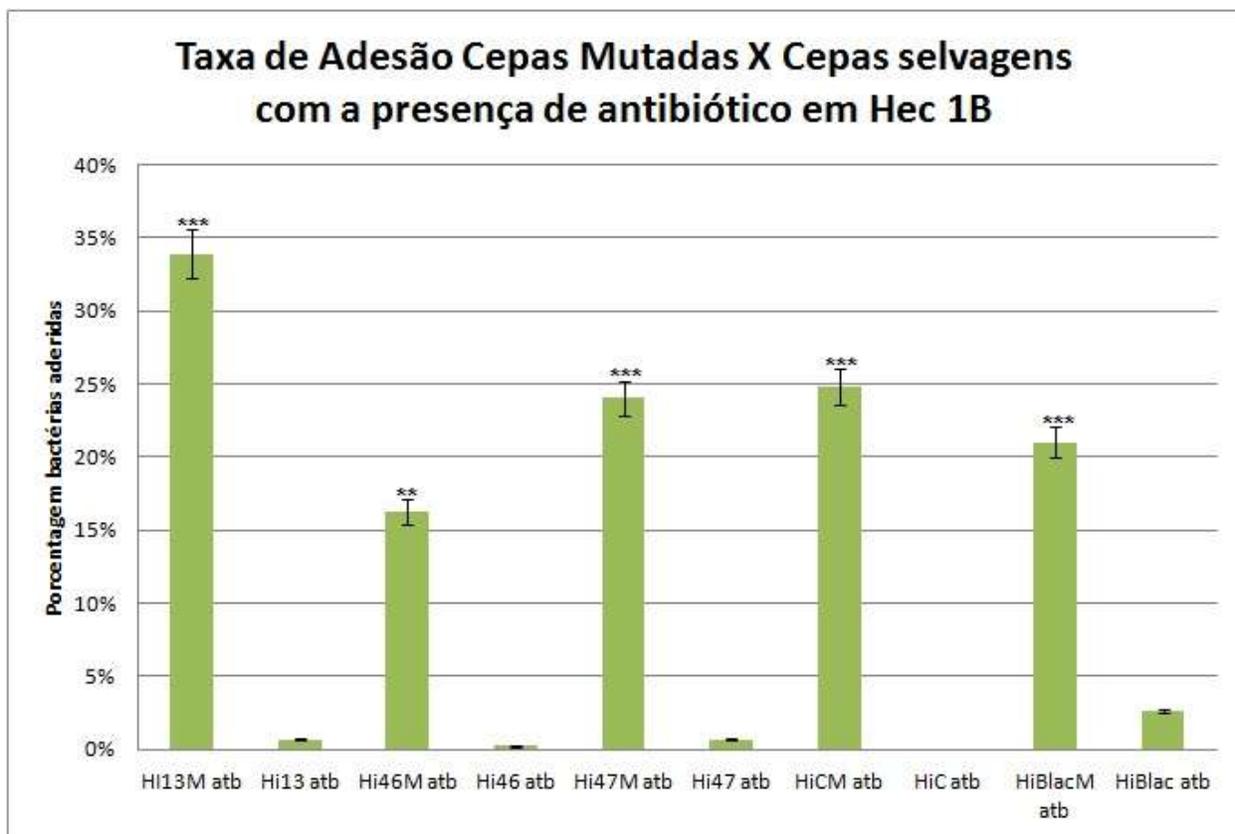


Figura 12: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas comparadas com cepas selvagens em linhagens celulares de Hec1B com a presença de antibiótico no meio. As linhagens mutadas de *H. influenzae* 13, 47, C e  $\beta$ lac apresentaram um valor de p significativo,  $p < 0,001$  (\*\*\*), a linhagem de *H. influenzae* 46 também apresentou um valor de p significativo de  $p < 0,01$  (\*\*).

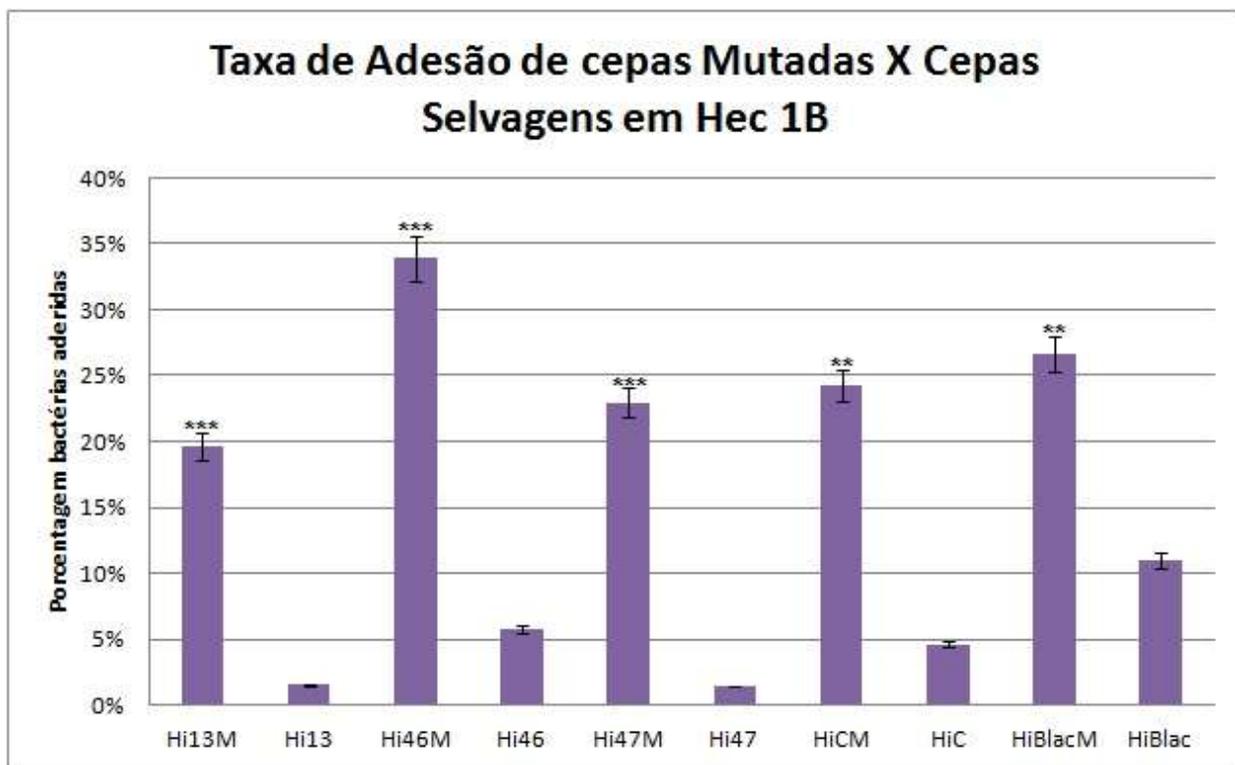


Figura 13: Gráfico da taxa de adesão de cepas mutadas comparadas com cepas selvagens em linhagens celulares de Hec1B sem a presença de antibiótico no meio. As linhagens mutadas de *H. influenzae* 13, 46 e 47 sem a presença de antibiótico apresentaram um valor de p significativo,  $p < 0,001$  (\*\*\*), quando comparadas as selvagens, enquanto as linhagens de *H. influenzae* C e  $\beta$ lac apresentaram um valor de p de  $p < 0,01$  (\*\*).

Na figura 10 podemos observar que a linhagem de *H. influenzae* Hi13Matb apresentou um valor de p significativo,  $p < 0,05$ , quando comparada com a cepa selvagem, enquanto a linhagem de Hi46M apresentou um valor de p também significativo,  $p < 0,05$ , entretanto ela se encontrava em um meio sem antibiótico ao contrário da Hi13Matb. As cepas selvagens se comportaram de maneira distinta, as linhagens de *H. influenzae* 46, C e  $\beta$ lac apresentaram valores de p

significativos,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, quando comparadas com as linhagens selvagens em meio com antibiótico (figura 11), demonstrando um aumento na taxa de adesão ao compararmos com a presença de antibiótico no meio de cultura. Quando comparamos as taxa de adesão entre linhagens mutantes e selvagens no meio de cultura com antibiótico, observamos que ocorre um aumento na taxa de adesão para todas as linhagens mutantes de *H. influenzae*. As linhagens Hi13Matb, Hi47Matb, HiCMatb e HiβlacMatb apresentaram um p significativo de  $p < 0,001$ , enquanto a linhagem Hi46Matb apresentou um  $p < 0,01$ , também significativo (figura 12). Já num meio sem antibiótico as linhagens mutadas também apresentaram uma maior taxa de adesão, como a *H. influenzae* 13, 46 e 47 com um p significativo de  $p < 0,001$  e as linhagens mutadas C e βlac com um  $p < 0,01$ , também significativo, ao serem comparadas com as selvagens.

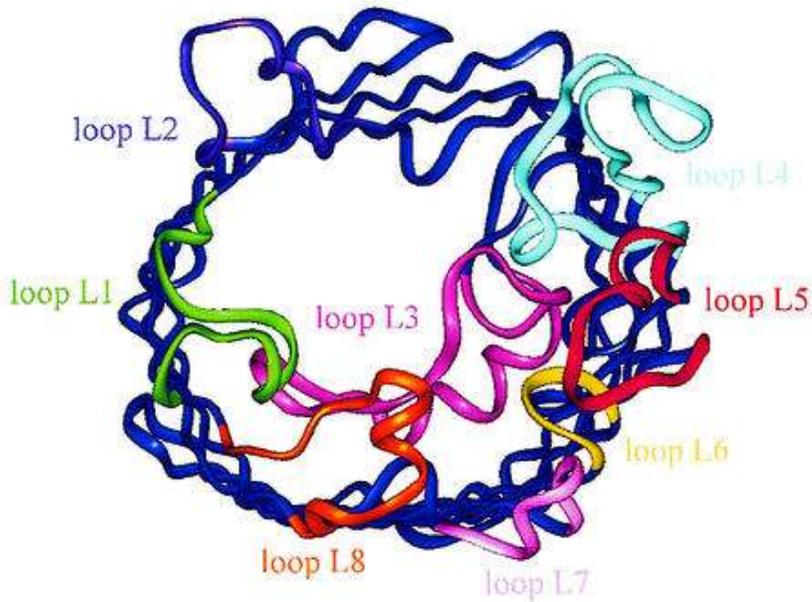
Na linhagem celular de Hec 1B as cepas bacterianas se comportaram de forma diferente com relação as taxas de adesão quando comparadas com a linhagem celular A549. Primeiramente podemos observar que taxa de adesão das linhagens selvagens foi menor do que a taxa das mutadas, no caso da linhagem celular Hec1B todas as linhagens mutadas com e sem a presença de antibiótico (figura 12 e 13) apresentaram valores de p significativos ao serem comparadas com as selvagens, esse comportamento não foi observado para linhagem celular A549 (figura 8 e 9). O cloranfenicol não se mostrou citotóxico para nenhuma linhagem celular (figura 4 e 5), a viabilidade celular foi de 83%, para ambas as linhagens celulares, em concentração de 2μg/ml, portanto o mesmo não poderia ter causado morte celular na linhagem Hec1B, levando a essa diferença na taxa de adesão. Uma possível causa para a diferença apresentada é a predileção do *H. influenzae* pelo trato respiratório superior, sendo o mesmo um comensal desse microambiente. Em contrapartida no endotélio, no qual somente se encontra em casos de meningite, a adaptação para o esse (corrente sanguínea) apresenta-se com uma limitação muito grande, uma vez que, são

microambientes de potencial evolucionário sem saída, pois as bactérias não conseguem passar para outro hospedeiro a partir do mesmo (Maughan and Redfield 2009). Provavelmente levando a uma menor adesão a essa linhagem celular.

Essa diminuição da taxa de adesão das cepas selvagens quando em presença de cloranfenicol sugere que pode ter ocorrido uma diminuição no crescimento bacteriano, ou seja, o antibiótico pode ter diminuído a viabilidade das células bacterianas, fazendo com que as cepas mutadas, resistentes ao antibiótico, aderissem mais. Como podemos observar na tabela 4 o CIM para cepas de *H. influenzae* 13, 47 e C foi de 2µg/ml, a mesma quantidade de cloranfenicol utilizada no experimento de adesão, que é suficiente para inibir o crescimento bacteriano, para linhagem 46 foi de 8µg/ml, que já a tornaria resistente, e para a βlac 4µg/ml, sendo intermediária. Após a mutação, todas as linhagens tiveram seu CIM aumentado, *H. influenzae* 13, 46 e 47 para 16µg/ml, *H. influenzae* C para 8µg/ml e *H. influenzae* βlac em 32µg/ml, ou seja, todas adquiriram uma resistência, e a 46 que já possuía teve sua resistência aumentada. A cepa bacteriana de *H. influenzae* 07, da qual foi retirada o gene para o processo de transformação, apresentou um CIM de 32µg/ml, demonstrando que a aquisição dessa resistência ajudou na sobrevivência dessas cepas quando colocadas em meio com antibiótico, fazendo com que as cepas mutantes aderissem em maior número de UFCs quando comparadas com as selvagens em ambas linhagens celulares A549 e Hec1B (Figuras 9 e 12). Esses resultados sugerem que mudanças no padrão de *ompP2* das cepas bacterianas poderia ser responsável pela mudança na taxa de adesão bacteriana. Como a porina (341 Aminoácidos e massa de 37,782 Da) na membrana externa de *H. influenzae* tipo b permite a difusão de pequenos solutos de massa molecular de até 1400Da no espaço periplasmático da bactéria, como antibióticos (Srikumar,

Dahan et al. 1997), ela provavelmente é a via de entrada do antibiótico na célula bacteriana, sendo a mesma também responsável pela peneira molecular na membrana externa de *H. influenzae* (Jeanteur, Lakey et al. 1991). Benson et al. (1988) demonstrou que mudanças nos aminoácidos das porinas eram correlacionados com diferenças na captura de moléculas pela membrana externa, e modificações no loop 1 (figura 15) poderiam alterar a função da porina (Benson, Occi et al. 1988).

A



B

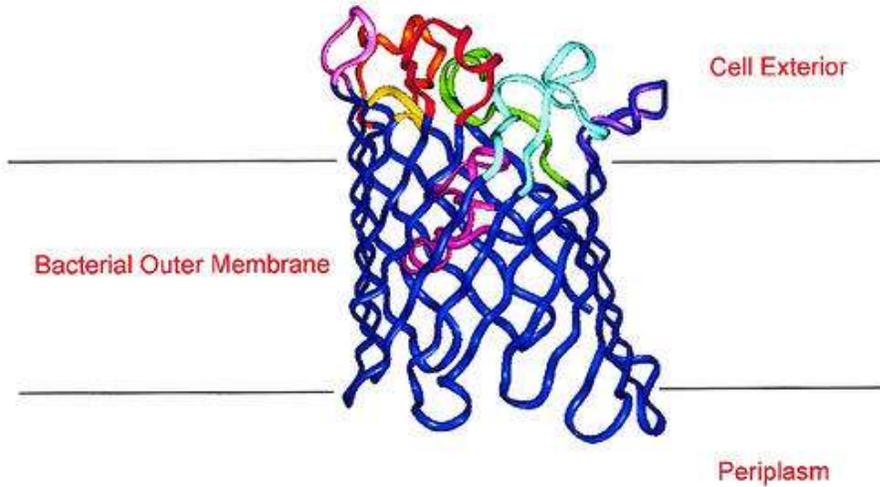


Figura 14: Modelo tridimensional do monômero P2 de *H. influenzae* tipo b baseado em estruturas de cristalografia de raio X de *Klebsiella pneumoniae* OmpK36 e *E. coli* OmpF. Os loops 1 a 8 estão com cores distintas. Em B podemos observar que o espaço extra celular é

localizado no topo e o espaço periplasmático no final, figura retirada de Galdiero et al. 2003 (Galdiero, Capasso et al. 2003).

Em estudo realizado por Regelink et al (1999) os variantes de *H. influenzae* diferiram em sua susceptibilidade a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e cloranfenicol, a sequência de DNA dos genes que codificavam *ompP2* possuíam diferenças entre os variantes de proteína *ompP2*, dos cinco variantes estudados após isolamento de pacientes com cepas resistentes a antibióticos, a cepa 70, do trabalho, demonstrou substituição de aminoácidos nas regiões correspondentes a curvas expostas na superfícies 4,5,6,7 e 8. Essa variabilidade seria mais relacionada com o perfil de antigenicidade (Regelink, Dahan et al. 1999). Entretanto, em estudos de Benso et al. demonstrou-se que mudanças nos aminoácidos das porinas eram correlacionadas com diferenças na captura de moléculas pela membrana externa, e modificações no loop 1 (figura 14) podendo alterar a função da porina (Benson, Occi et al. 1988). Como os loops 1 e 3 encontram-se na abertura da porina, conforme podemos observar na figura 15, mudanças nos aminoácidos desses loops poderiam influenciar na abertura do canal, fazendo com que ocorresse uma dificuldade na entrada do antibiótico, impedindo o fluxo do mesmo para dentro do espaço periplasmático. Tal fato explicaria a resistência a antibióticos da cepa *H. influenzae* 07 que possui esse gene *ompP2* modificado, que foi transferido para as demais linhagens.

Os dados apresentados demonstraram que a porina possivelmente ajuda na melhora da taxa de adesão de cepas *H. influenzae*, em termos de quantidade de UFCs, quando as mesmas possuem o gene *ompP2* vindo da cepa de *H. influenzae* 07. Podendo-se estabelecer uma conexão entre a aquisição de resistência, devido a modificação da P2, com uma melhora da viabilidade da bactéria em aderir com maior número de UFC em linhagens celulares distintas, mesmo as quais

elas tem uma predileção diminuída, como a Hec1B. Teríamos então uma Porina modificada ajudando a aumentar a adesão (em UFC) da bactéria mutada em linhagens celulares.

Um maior nível de significância foi verificado para comparação de cepas mutantes e selvagens em linhagem celular Hec1B. A única exceção foi a linhagem 46M que apresentou uma melhor taxa de adesão sem o antibiótico no meio (figura 10), não se sabe ao certo porque essa diferença, entretanto, a linhagem já apresentava resistência a cloranfenicol (tabela 4) antes mesmo da mutação. Já as linhagens selvagens em Hec1B (figura 11) provavelmente tiveram seu crescimento inibido pela concentração do antibiótico no experimento, como podemos observar pelos valores de p no teste de adesão das linhagens 46, C e  $\beta$ lac sem a presença do antibiótico, o que não veio a ocorrer com a linhagem A549. Todas as linhagens selvagens aderiram de maneira semelhante não apresentando significância (figura 6), enquanto algumas mutadas apresentaram uma significância na presença do antibiótico - linhagens CM e  $\beta$ lacM (figura 7).

Portanto, o gene *ompP2* foi adquirido por diversas cepas de sorotipos diferentes, (c, b, a, e, f) e cepas não capsuladas NTHi, demonstrando que o mesmo estaria presente em demais cepas capsuladas e não capsuladas de *H. influenzae* de modo amplo, levando a um provável alvo vacinal mais universal para *H. influenzae*. Uma vez que, essa proteína encontra-se na membrana externa bacteriana e os resultados de adesão levam a creer que essa porina apresenta uma certa virulência, e sua presença possibilita a melhor adesão bacteriana a superfície celular.

Quando comparamos a porina de *H. influenzae* com outras bactérias, observamos a presença de similaridades entre elas. A proteína *ompP2* de *H. influenzae* é encontrada num grau de homologia de 18% com a *ompF* de *Escherichia coli* (Jeanteur, Lakey et al. 1991). Além disso a

presença de diversos loops, leva a creer que potencialmente existem vários epítomos conservados entre espécies, que são necessários para sobrevivência da bactéria (figura 14).

## 5 - Conclusão

- Houve a transferência do gene *ompP2* de cepa de *H. influenzae* multirresistente 07 para cepas selvagens, tabela 1.
- Uma cepa bacteriana a *H. influenzae* 38 apresentou uma melhor taxa de transformação com a presença de nanopartículas de óxido de grafeno com um valor de p significativo,  $p < 0,001$ .
- As cepas mutadas de *H. influenzae* com o gene *ompP2* apresentaram uma melhor taxa de adesão do que as cepas selvagens.
- A taxa de adesão das cepas mutadas foi aumentada quando o antibiótico cloranfenicol foi colocado no meio de cultura celular, fazendo com que as linhagens mutadas aderissem mais, tanto em células A549 e Hec1B.

## 6- Perspectivas

- Verificar aumento da taxa de transformação com diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de grafeno e mesmo outras nanopartículas.
- Verificar se ocorre um aumento da expressão de *ompP2* através de PCR real time.
- Repetir ensaio de teste de concentração inibitória mínima com linhagem de *H. influenzae* 38.
- Sequenciar gene *ompP2* de *H. influenzae* linhagem 07 e compara com linhagem selvagem e mutada.

## 7 - Referências bibliográficas

- (1998). Liquid PedvaxHIB® [Haemophilus b Conjugate Vaccine (Meningococcal Protein Conjugate)]
- (2000). Introduction of Haemophilus influenzae type b vaccine into immunization programmes Management guidelines, including information for health workers and parents. DEPARTMENT OF VACCINES AND BIOLOGICALS, World Health Organization
- (2009). Haemophilus b Conjugate Vaccine (Tetanus Toxoid Conjugate) ActHIB®.
- Arbing, M. A., J. W. Hanrahan, et al. (2002). "Altered channel properties of porins from Haemophilus influenzae: isolates from cystic fibrosis patients." J Membr Biol **189**(2): 131-41.
- Bae, S., J. Lee, et al. (2010). "Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 65-71.
- Baggett, H. C., T. W. Hennessy, et al. (2006). "Immunologic response to Haemophilus influenzae type b (Hib) conjugate vaccine and risk factors for carriage among Hib carriers and noncarriers in Southwestern Alaska." Clin Vaccine Immunol **13**(6): 620-6.
- Barenkamp, S. J., R. S. Munson, Jr., et al. (1981). "Subtyping isolates of Haemophilus influenzae type b by outer-membrane protein profiles." J Infect Dis **143**(5): 668-76.
- Benfatti, C. S., Cordova, S.M., Guedes, A., Magina, M.D.A., Cordova, C.M.M. (2010). "Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de Eugenia sp frente a cepas de mollicutes." Rev Pan-Amaz Saude **1**(2): 33-39.

- Benson, S. A., J. L. Occi, et al. (1988). "Mutations that alter the pore function of the OmpF porin of Escherichia coli K12." J Mol Biol **203**(4): 961-70.
- Booy, R., P. T. Heath, et al. (1997). "Vaccine failures after primary immunisation with Haemophilus influenzae type-b conjugate vaccine without booster." Lancet **349**(9060): 1197-202.
- Borenfreund, E. and O. Borrero (1984). "In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test." Cell Biol Toxicol **1**(1): 55-65.
- Burns, J. L., P. M. Mendelman, et al. (1985). "A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in Haemophilus influenzae." Antimicrob Agents Chemother **27**(1): 46-54.
- Cerquetti, M., M. L. Ciofi degli Atti, et al. (2004). "Haemophilus influenzae serotype e meningitis in an infant." Clin Infect Dis **38**(7): 1041.
- Cerquetti, M., M. Giufre, et al. (2007). "First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable Haemophilus influenzae isolates." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3155-61.
- Chen, I. and D. Dubnau (2004). "DNA uptake during bacterial transformation." Nat Rev Microbiol **2**(3): 241-9.
- Cochi, S. L., C. V. Broome, et al. (1985). "Immunization of US children with Hemophilus influenzae type b polysaccharide vaccine. A cost-effectiveness model of strategy assessment." JAMA **253**(4): 521-9.
- Dimopoulou, I. D., J. Z. Jordens, et al. (1997). "A molecular analysis of Greek and UK Haemophilus influenzae conjugative resistance plasmids." J Antimicrob Chemother **39**(3): 303-7.

- Dimopoulou, I. D., W. A. Kraak, et al. (1992). "Molecular epidemiology of unrelated clusters of multiresistant strains of Haemophilus influenzae." J Infect Dis **165**(6): 1069-75.
- Foster, K. A., C. G. Oster, et al. (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism." Exp Cell Res **243**(2): 359-66.
- Foxwell, A. R., J. M. Kyd, et al. (1998). "Nontypeable Haemophilus influenzae: pathogenesis and prevention." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 294-308.
- Galdiero, S., D. Capasso, et al. (2003). "Role of surface-exposed loops of Haemophilus influenzae protein P2 in the mitogen-activated protein kinase cascade." Infect Immun **71**(5): 2798-809.
- Galil, K., R. Singleton, et al. (1999). "Reemergence of invasive Haemophilus influenzae type b disease in a well-vaccinated population in remote Alaska." J Infect Dis **179**(1): 101-6.
- Gazagne, L., C. Delmas, et al. (1998). "Molecular epidemiology of ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing Haemophilus influenzae." J Clin Microbiol **36**(12): 3629-35.
- Gilsdorf, J. R., C. F. Marrs, et al. (2004). "Haemophilus influenzae: genetic variability and natural selection to identify virulence factors." Infect Immun **72**(5): 2457-61.
- Hansen, E. J., C. Hasemann, et al. (1989). "Primary structure of the porin protein of Haemophilus influenzae type b determined by nucleotide sequence analysis." Infect Immun **57**(4): 1100-7.
- Hollanda, L. M., G. C. Cury, et al. "Effect of mesoporous silica under Neisseria meningitidis transformation process: environmental effects under meningococci transformation." J Nanobiotechnology **9**: 28.

- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins: p. 175-290.
- Jardetzky, O. (1963). "Studies on the mechanism of action of chloramphenicol. I. The conformation of chloramphenicol in solution." J Biol Chem **238**: 2498-508.
- Jeanteur, D., J. H. Lakey, et al. (1991). "The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction." Mol Microbiol **5**(9): 2153-64.
- Kim, N., G. Choi, et al. "An open-label, single-arm, phase I study to evaluate the safety and immunogenicity of LBVH0101, a new Haemophilus influenzae type b tetanus toxoid conjugate vaccine, in healthy adult volunteers." Arch Pharm Res **33**(6): 919-24.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Stravic, S. (1977). " Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli." Infection and Immunity **18**(3): 775-779.
- Koyama, J., K. Ahmed, et al. (2007). "Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable haemophilus influenzae in a mouse model." Tohoku J Exp Med **211**(1): 63-74.
- Kroll, J. S., P. R. Langford, et al. (1991). "Copper-zinc superoxide dismutase of Haemophilus influenzae and H. parainfluenzae." J Bacteriol **173**(23): 7449-57.
- Kroll, J. S., K. E. Wilks, et al. (1998). "Natural genetic exchange between Haemophilus and Neisseria: intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12381-5.
- Lancellotti, M., F. Pace, et al. (2008). "Ribotyping, biotyping and capsular typing of Haemophilus influenzae strains isolated from patients in Campinas, southeast Brazil." Braz J Infect Dis **12**(5): 430-7.

- Leaves, N. I., I. Dimopoulou, et al. (2000). "Epidemiological studies of large resistance plasmids in Haemophilus." J Antimicrob Chemother **45**(5): 599-604.
- Mandomando, I., B. Sigauque, et al. "Antimicrobial drug resistance trends of bacteremia isolates in a rural hospital in southern Mozambique." Am J Trop Med Hyg **83**(1): 152-7.
- Manning, L., M. Laman, et al. "Increasing chloramphenicol resistance in Streptococcus pneumoniae isolates from Papua New Guinean children with acute bacterial meningitis." Antimicrob Agents Chemother **55**(9): 4454-6.
- Mattos, I. B., D. A. Alves, et al. "Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under Neisseria meningitidis transformation process." J Nanobiotechnology **9**: 53.
- Maughan, H. and R. J. Redfield (2009). "Extensive variation in natural competence in Haemophilus influenzae." Evolution **63**(7): 1852-66.
- Maughan, H. and R. J. Redfield (2009). "Tracing the evolution of competence in Haemophilus influenzae." PLoS One **4**(6): e5854.
- Mell, J. C., S. Shumilina, et al. "Transformation of natural genetic variation into Haemophilus influenzae genomes." PLoS Pathog **7**(7): e1002151.
- Murphy, T. F. and L. C. Bartos (1988). "Human bactericidal antibody response to outer membrane protein P2 of nontypeable Haemophilus influenzae." Infect Immun **56**(10): 2673-9.
- Murphy, T. F. and L. C. Bartos (1988). "Purification and analysis with monoclonal antibodies of P2, the major outer membrane protein of nontypable Haemophilus influenzae." Infect Immun **56**(5): 1084-9.

- Organization, W. H. (2011). "Invasive Haemophilus influenzae type B (Hib) Disease Prevention." New and Under-utilized Vaccines Implementation (NUVI), from <http://www.who.int/nuvi/hib/en/>.
- Park, J. Y., K. A. Kim, et al. (2003). "Chloramphenicol is a potent inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP2C19 and CYP3A4 in human liver microsomes." Antimicrob Agents Chemother **47**(11): 3464-9.
- Peltola, H. (2000). "Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates." Clin Microbiol Rev **13**(2): 302-17.
- Rahman, M., S. Hossain, et al. (2008). "Haemophilus influenzae type-b and non-b-type invasive diseases in urban children (<5years) of Bangladesh: implications for therapy and vaccination." J Infect **56**(3): 191-6.
- Regelink, A. G., D. Dahan, et al. (1999). "Variation in the composition and pore function of major outer membrane pore protein P2 of Haemophilus influenzae from cystic fibrosis patients." Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 226-32.
- Ribeiro, H., Assunção, J.V. (2002). "Efeitos das queimadas na saúde humana." Estudos Avançados **16**(24).
- Rojas-Chapana, J., J. Troszczyńska, et al. (2005). "Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into Escherichia coli cells." Lab Chip **5**(5): 536-9.
- Scaletsky, I. C., M. L. Silva, et al. (1984). "Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells." Infect Immun **45**(2): 534-6.

- Singleton, R., L. Hammitt, et al. (2006). "The Alaska Haemophilus influenzae type b experience: lessons in controlling a vaccine-preventable disease." Pediatrics **118**(2): e421-9.
- Spence, J. M. and V. L. Clark (2000). "Role of ribosomal protein L12 in gonococcal invasion of Hec1B cells." Infect Immun **68**(9): 5002-10.
- Srikumar, R., D. Dahan, et al. (1997). "Porins of Haemophilus influenzae type b mutated in loop 3 and in loop 4." J Biol Chem **272**(21): 13614-21.
- Takahata, S., T. Ida, et al. (2007). "Horizontal gene transfer of ftsI, encoding penicillin-binding protein 3, in Haemophilus influenzae." Antimicrob Agents Chemother **51**(5): 1589-95.
- Turk, D. C. (1984). "The pathogenicity of Haemophilus influenzae." J Med Microbiol **18**(1): 1-16.
- Varela JN, I. J. M., de Hollanda LM, Lancellotti M (2012). "Membrane Protein as Novel Targets for Vaccine Production in Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis." J Vaccines Vaccination **3**(152).
- Wang, A., S. Yu, et al. (2008). "Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenzae strains and antibiotics usage patterns in pediatric outpatients: results from a children's hospital in China (2000-2004)." Pediatr Pulmonol **43**(5): 457-62.
- Wang, S. R., M. H. Tseng, et al. (2005). "Fatal non-typeable Haemophilus influenzae sepsis complicated with acute respiratory distress syndrome: case report and literature review." Scand J Infect Dis **37**(11-12): 921-5.
- Wang, Y. J., E. Vuori-Holopainen, et al. (2002). "Relative frequency of Haemophilus influenzae type b pneumonia in Chinese children as evidenced by serology." Pediatr Infect Dis J **21**(4): 271-7.

- Who. (2011). "Invasive Haemophilus influenzae type B (Hib) Disease Prevention." New and Under-utilized Vaccines Implementation (NUVI), from <http://www.who.int/nuvi/hib/en/>.
- Wilder, M. A., Cockerill III, F.R., Craig, W.A., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Hecht, D.W., Hindler, J.F., Low, D.E., Sheehan, D.J., Tenover, F.C., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L., Ferraro, M.J., Swenson, J.M. (2005). Normas de Desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana. 1. O. P.-A. d. S. NCCLS, Anvisa.
- Wolf, J. and A. J. Daley (2007). "Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: typical pathogens." Paediatr Respir Rev **8**(3): 204-10, quiz 210-1.
- Yamanaka, N., M. Hotomi, et al. (2008). "Clinical bacteriology and immunology in acute otitis media in children." J Infect Chemother **14**(3): 180-7.
- Zhao, Q. Q. B., A.; CHOWDHRY, U. (2003). "Nanotechnology in the Chemical Industry – Opportunities and Challenges." Journal of nanoparticles Research **5**(5-6): 567–572.