

**Maria Cecília Krähenbühl Amstalden**

**Efeito de nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto  
de boro na transformação de *Streptococcus pneumoniae***

**CAMPINAS  
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

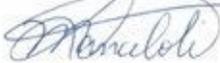
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**MARIA CECÍLIA KRÄHENBÜHL AMSTALDEN**

**“Efeito de nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto de boro na transformação de *Streptococcus pneumoniae*”**

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata

**Maria Cecília Krähenbühl  
Amstalden**



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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

CAMPINAS,  
2013

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

Am87e Amstalden, Maria Cecília Krähenbühl, 1988-  
Efeito de nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto de boro na transformação de *Streptococcus pneumoniae* / Maria Cecília Krähenbühl Amstalden. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Transformação bacteriana. 2. Nanopartículas. 3. *Streptococcus pneumoniae*. 4. Calorimetria de titulação isotérmica. I. Lancellotti, Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effect of mesoporous silica nanoparticles and boron nitride nanotubes on the transformation of *Streptococcus pneumoniae*

**Palavras-chave em inglês:**

Bacterial transformation

Nanoparticles

*Streptococcus pneumoniae*

Isothermal titration calorimetry

**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

Cintia Saia Cereda

**Data de defesa:** 27-09-2013

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

Campinas, 27 de setembro de 2013

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino



Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda



Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel

---

Assinatura

Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat

---

Assinatura

## Resumo

*Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria gram-positiva que coloniza assintomaticamente o trato respiratório superior em humanos; contudo é capaz de causar doenças em indivíduos susceptíveis, como pneumonia, otite média e meningite. A sua capacidade de se adaptar facilmente ao ambiente deve-se ao fato de ser naturalmente transformável e muitas vezes este processo sofre influências externas. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto de carbono na transformação de pneumococo, além de verificar suas interações com material genético através de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Foi construído um vetor plasmidial para deleção do gene *luxS*, responsável pela formação de biofilme em *S. pneumoniae*. A partir deste material, foram realizados ensaios de transformação em contato com as nanopartículas. Os nanotubos de nitreto de boro aumentaram a taxa de transformação na bactéria com uma concentração de 30 µg/mL, Uma vez que os resultados com nanopartículas de sílica mesoporosa somente puderam ser observados a partir de uma concentração de 50 µg/mL, acredita-se que há uma interação deste nanomaterial com a enzima DNase, produzida em maior quantidade por bactérias gram-positivas. Os nanotubos de nitreto de boro aumentaram a taxa de transformação na bactéria com uma concentração menor de 30 µg/mL, levantando a hipótese da interação com o DNA exógeno. Verificou-se, portanto, a interação de BNNT com material genético a partir de ITC. A curva típica de saturação indica uma interação entre ambos os sistemas, podendo esta nanoestrutura ser utilizada futuramente para carreamento de genes.

## Abstract

*Streptococcus pneumoniae* is a gram-positive bacterium which colonizes asymptotically the human respiratory upper tract. However, it is capable of causing many diseases in susceptible individuals, like pneumonia, otitis and meningitis. Its capacity of adapting itself to the environment is due to be naturally transformable and this process many times suffers external influences. The purpose of this work is to analyze the effect of mesoporous silica nanoparticles and boron nitride nanotubes on the pneumococcal transformation and to verify their interactions with DNA through Isothermal Titration Calorimetry (ITC). A plasmidial vector was built to delete the biofilm formation responsible gene *luxS*. With this material, transformation assays with nanoparticles were made. Once the results of mesoporous silica nanoparticles increased the transformation ratio with a threshold concentration up to 50  $\mu\text{g/mL}$ , it is believed that this nanomaterial interacts with the bacterial DNase, which is released in greater quantities in gram-positive bacteria than in gram-negatives. As for the boron nitride nanotubes, their increase of transformation ratio started at a concentration of 30  $\mu\text{g/mL}$ , possibly interacting with exogenous DNA strains. Their saturation curve given by ITC showed a clear interaction with DNA.

# Sumário

<i>Resumo</i> .....	<i>vi</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>vii</i>
<i>Agradecimentos</i> .....	<i>x</i>
<i>Lista de Tabelas</i> .....	<i>xiii</i>
<i>Lista de Figuras</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Lista de abreviações</i> .....	<i>xvi</i>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Streptococcus pneumoniae .....	1
1.2 Transformação em Streptococcus pneumoniae.....	2
1.3 Formação de biofilme .....	5
1.4 Nanobiotecnologia .....	7
1.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	8
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Material e métodos</b> .....	<b>12</b>
3.1 Meios de cultura.....	12
3.2 Linhagens bacterianas e condições de crescimento .....	13
3.3 Síntese dos nanomateriais.....	15
3.3.1 Nanotubos de nitreto de boro.....	15
3.3.2 Nanopartículas de sílica mesoporosa.....	15
3.4 Metodologia da Extração DNA Genômico .....	16
3.5 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	17
3.6 Construção do vetor de mutação $\Delta luxS$ .....	20
3.7 Transformação de Streptococcus pneumoniae com o vetor de mutação $\Delta luxS$ ..	23
3.8 Ensaio do efeito das nanopartículas na transformação de Streptococcus pneumoniae .....	23
3.9 Preparação dos nanotubos de nitreto de boro para análise por ITC.....	24
3.10 Análise da interação de DNA com BNNT por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	24
3.11 Análise da interação de DNA com nanotubo de nitreto de boro por eletroforese de retardo.....	27
3.12 Análise estatística .....	28
<b>4 Resultados e discussão</b> .....	<b>29</b>
4.1 Construção do vetor plasmidial $\Delta luxS$ .....	29
4.2 Transformação de Streptococcus pneumoniae com o vetor de mutação $\Delta luxS$ ..	30
4.3 Ensaio de transformação de Streptococcus pneumoniae com nanopartículas...	32

<b>4.4</b>	<b>Análise da interação de DNA com BNNT por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise da interação de DNA com nanotubo de nitreto de boro por eletroforese de retardo.....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b><i>Conclusão</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b><i>Perspectivas futuras</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b><i>Referências bibliográficas</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b><i>Anexos</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>8.1</b>	<b>Tabela de valores.....</b>	<b>61</b>

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente ao prof. Marcelo Lancellotti não apenas pela orientação e pela amizade criada ao longo destes anos, mas principalmente por ter sido o responsável a abrir os meus olhos para seguir a pesquisa como paixão de vida e profissão. Este trabalho jamais existiria se não fosse por você, Marcelo.

À Doutora Luciana Maria de Hollanda, pelas suas palavras quando precisei, pelos cafés e ensinamentos de vida e de ciência.

Aos professores da UFPR Marcos Mafra e Luciana Igarashi Mafra, por terem me auxiliado e recebido de forma excepcional durante a minha estadia em Curitiba.

Ao pessoal do laboratório, que a cada um tenho algo pelo que agradecer: à Rafaella Carneiro, que sempre teve uma enorme paciência para me ensinar e ajudar no laboratório e cuja amizade e companheirismo são inestimáveis. Ao Danilo Antonini, que desde o primeiro dia já virou meu companheiro inseparável e seu estilo de vida de pouca ideia e v1d4l0k4 te torna um dos amigos mais sensacionais que poderia ter! Ao Mário Izidoro, desde a época em que dormia no seu colo no CopaFarma até as festinhas de agora, sempre esteve presente para mim. A sua falta na minha vida vai ser imensa. À Cibele Zanardi, minha amizade revelação, que se esta fosse a seção de agradecimentos do meu TCC, não teria seu nome citado aqui, mas hoje em dia é uma das pessoas a quem eu mais tenho que agradecer pela amizade, pois ela vale ouro. À Ana Carolina Afonso, pelos serviços prestados em nome da zoeira e pela bandidagem. Aos IC's Washington da Silva, Natali Carletti, Carolina Zorzetto e Renan Kosseki, por toda a ajuda no laboratório quando precisei e pelas risadas. Um agradecimento especial também ao meu irmãozinho de laboratório e de vida Ives Bernardelli, que sempre esteve para me ajudar quando eu mais precisei independentemente da situação. Um amigo

como você não se encontra sempre na vida e sou plenamente grata por ter tido essa bênção. Obrigada, irmão.

Ao Prof. Rodrigo Ramos Catharino, que é acima de tudo um grande amigo e um modelo de ser humano. Todas as nossas conversas levo no meu coração e sou muito feliz pela consideração ímpar que tem por mim também. Ao pessoal de seu laboratório, Diogo Noin (só alergia!), Sabrina Sartor, Mônica Siqueira, Lívia Riberti e Natália Damário, muito obrigada por tudo.

À minha família, sempre presente e minha maior incentivadora a seguir meus passos.

A Deus, por sempre me instruir a seguir o melhor caminho.

Obrigada.

Maria Cecília Krähenbühl Amstalden

*"Ciência serve para nos dar uma ideia de  
quão extensa é a nossa ignorância"*

*(Félicité Robert de Lamennais)*

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1:** - Linhagens de *Streptococcus pneumoniae* usadas neste trabalho – **página 15**

**Tabela 2:** - Oligonucleotídeos usados neste trabalho – **página 19**

**Tabela 3:** - Amostras analisadas por ITC – **página 27**

**Tabela 4:** - Valores obtidos de UFC na transformação de Pn360 em contato com nanopartículas – **página 34**

**Tabela 5:** - valores obtidos de UFC na transformação de Pn360 em contato com as nanoestruturas – **página 39**

## Lista de Figuras

**Figura 1:** - Esquema do processo de *quorum-sensing* para a aquisição de competência em *Streptococcus pneumoniae* – **página 4**

**Figura 2:** - Biossíntese da molécula autoindutora 2 (AI-2) – **página 6**

**Figura 3:** - Esquema representativo de uma seringa contendo a substância ligante e a cela da amostra de um calorímetro e isoterma típica da interação de um ligante com uma macromolécula – **página 9**

**Figura 4:** - Representação esquemática da inserção do cassete de resistência *aaDa* em relação ao gene *luxS* – **página 30**

**Figura 5:** - Esquema da construção do vetor plasmidial pLUX2 e sua transformação em *S. pneumoniae*, gerando um mutante resistente à espectinomicina – **página 31**

**Figura 6:** - Taxa de transformação de *S. pneumoniae* em contato com 30 µg de nanoestruturas – **página 32**

**Figura 7:** - Taxa de transformação de *S. pneumoniae* em contato com 50 e 100 µg de nanopartículas de sílica mesoporosa SBa15 e SBa16 – **página 37**

**Figura 8:** - Isotherma não tratada e tratada da interação de ATP com BNNT. – **página 41**

**Figura 9:** - Isotherma não tratada e tratada da interação de TTP com BNNT. – **página 42**

**Figura 10:** - Isotherma não tratada e tratada da interação de CTP com BNNT. – **página 43**

**Figura 11:** - Isotherma não tratada e tratada da interação de GTP com BNNT. – **página 44**

**Figura 12:** - Isotherma não tratada e tratada da interação do oligonucleotídeo *glnA2* com BNNT. – **página 47**

**Figura 13:** - Isoterma não tratada e tratada da interação do plasmídeo pLUC com BNNT. – **página 48**

**Figura 14:** - Eletroforese da interação de pLUC com BNNT. – **página 50**

## **Lista de abreviações**

µg: micrograma

µL: microlitro

Atb: antibiótico

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Trifosfato de adenosina

BHI: Brain Heart Infusion

BNNT: nanotubo de nitreto de boro, sigla do inglês boron nitride nanotube

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

CSP: peptídeo estimulador de competência, sigla do inglês competence stimulating peptide

CTP: Trifosfato de citidina

DNA: ácido desoxirribonucléico

g: gramas

GTP: Trifosfato de guanosina

IAL: Instituto Adolfo Lutz

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

IPTG: Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

ITC: Calorimetria de Titulação Isotérmica, sigla do inglês Isothermal Titration Calorimetry

LBMB – Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana – IB – UNICAMP

mL: mililitro

m/v: massa por volume

pb: pares de base

QS: *quorum-sensing*

RNA: ácido ribonucleico

RPM: Rotação por minuto

SBa-15: nanopartícula de sílica mesoporosa Santa Barbara 15

SBa-16: nanopartícula de sílica mesoporosa Santa Barbara 16

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SEM: Microscopia Eletrônica de Varredura

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

TTP: Trifosfato de timidina

SFB: Soro Fetal Bovino

UFC: Unidade formadora de colônia

v/v: volume por volume

xGAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

# 1. Introdução

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae*, também conhecida como pneumococo, é uma bactéria gram-positiva que coloniza de forma assintomática o trato respiratório superior em seres humanos. Apesar disso, é um dos principais patógenos oportunistas, podendo causar inúmeras doenças como pneumonia, meningite, otite média e septicemia, especialmente em indivíduos que se enquadram em grupos de risco (Ispahani, Slack et al. 2004, Kadioglu, Weiser et al. 2008, Trappetti, Kadioglu et al. 2009). O pneumococo é responsável por uma alta taxa de mortalidade e morbidade em idosos, crianças e pacientes imunocomprometidos; estes são até cem vezes mais susceptíveis a doenças pneumocócicas invasivas, uma vez que possuem menor proteção fornecida pela barreira de mucosa e menor capacidade de eliminar patógenos (Imran, Leng et al. 2005, Blossom, Namayanja-Kaye et al. 2006, Joloba, Kidenya et al. 2010). *S. pneumoniae* é a maior causadora de pneumonias em idosos (Cilloniz, Polverino et al. 2013), ao mesmo tempo em que é responsável por 44% dos casos de internação hospitalar por infecções respiratórias em crianças com menos de dois anos de idade (Nieto, Riquelme et al. 2013). Os quadros clínicos são ainda piores em países subdesenvolvidos, devido à falta de acesso a serviços médicos de qualidade e também a medicamentos antimicrobianos. A taxa de infecções pneumocócicas em crianças de até seis anos de idade nestes países é três a oito vezes mais alta que em países do oeste europeu e da América do Norte (Hausdorff, Siber et al. 2001, O'Brien, Wolfson et al. 2009).

## **1.2 Transformação em *Streptococcus pneumoniae***

O pneumococo é um grande problema à saúde pública não apenas pela sua patogenicidade, mas também pela sua enorme facilidade de se adaptar ao ambiente em que se encontra. Tal adaptação se dá principalmente pela transferência horizontal de genes, sendo a transformação sua forma mais comum em *S. pneumoniae* (Johnsborg and Havarstein 2009, Croucher, Harris et al. 2012, Syvanen 2012). O mecanismo da transformação ocorre pela captação de fragmento de DNA presente no meio extracelular e sua incorporação no material genômico da bactéria. Para tal, é necessário que o pneumococo adquira seu estado competente, que se baseia na expressão de um set de genes responsáveis pela ligação com o DNA dupla-fita (dsDNA) exógeno, internalização do DNA simples-fita (ssDNA) extraído do dsDNA exógeno doador e pela integração do ssDNA ao DNA cromossomal (Attaiech, Olivier et al. 2011).

A aquisição de competência por *S. pneumoniae* é resultado de um processo de autoindução causado pela liberação de uma molécula sinalizadora no meio extracelular pelas próprias bactérias. Quando atinge um limiar de concentração, a molécula autoindutora desencadeia a expressão do set de genes responsáveis pelo estado de competência (Mercenier and Chassy 1988, Lorenz and Wackernagel 1994, Havarstein, Coomaraswamy et al. 1995). Este fenômeno é chamado *quorum-sensing* e é considerado uma forma de comunicação entre as bactérias que visa principalmente a sobrevivência da espécie em ambientes hostis (Steinmoen, Knutsen et al. 2002, Mangwani, Dash et al. 2012).

Em *Streptococcus pneumoniae*, o processo de *quorum-sensing* é causado pela expressão de genes situados no *locus com*. Neste *locus* encontra-se o gene *comC*, gene pertencente ao *operon comCDE*, que produz a molécula autoindutora responsável pela aquisição da competência, um peptídeo de dezessete aminoácidos denominado Competence

Stimulating Peptide (CSP) (Havarstein, Coomaraswamy et al. 1995, Johnsberg and Havarstein 2009, Cassone, Gagne et al. 2012). Este peptídeo é secretado para o meio extracelular pelo complexo ComAB, constituído por um transportador ABC ComA e sua proteína acessória ComB, produtos do *operon comAB* (Chandler and Morrison 1988, Hui and Morrison 1991). Uma vez secretado para o meio extracelular, o CSP se acumula até atingir um limiar de concentração que por sua vez é detectado pelo receptor histidina-quinase ComD. Esta interação CSP-ComD leva a uma mudança na conformação do domínio transmembrana do receptor levando à sua atividade de quinase e à fosforilação do seu cognato regulador de resposta ComE (Pestova, Havarstein et al. 1996, Iannelli, Oggioni et al. 2005). Esta proteína, quando fosforilada, reconhece sítios de ligação específicos dos *loci com* e atua como um fator de transcrição, gerando um *feedback* positivo tanto nos operons *comAB* e *comCDE*, aumentando assim a produção de CSP, quanto ativando o gene *comX* (Ween, Gaustad et al. 1999). Este gene, encontrado em duas cópias idênticas no material genômico de *S. pneumoniae*, produz um fator sigma denominado ComX, ou  $\sigma^x$ , que funciona como uma conexão direta entre o processo de *quorum-sensing* e a ativação dos genes responsáveis pela competência na bactéria (Luo, Li et al. 2003). A proteína ComX é considerada a última peça do complexo mecanismo de *quorum-sensing* em pneumococo, esquematizado na Figura 1.

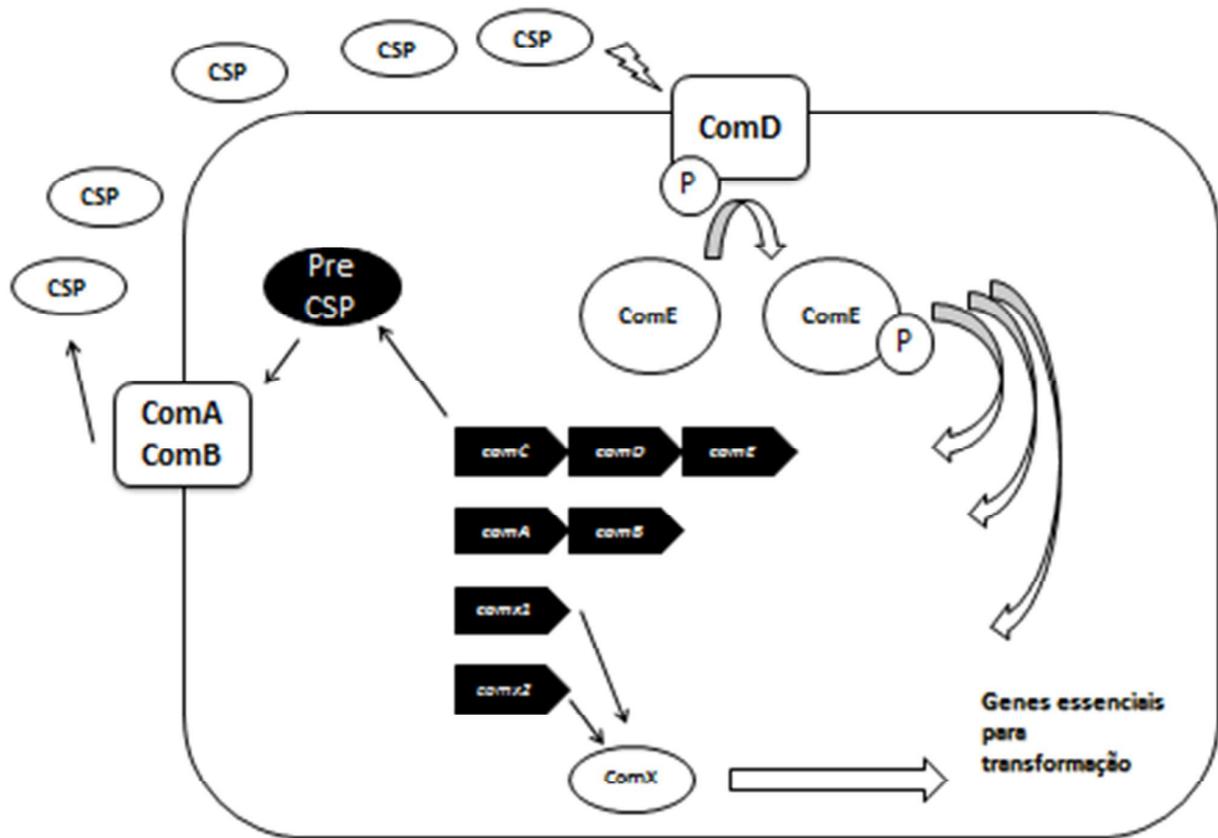


Figura 1 - Esquema do processo de *quorum-sensing* para a aquisição de competência em *Streptococcus pneumoniae*. A molécula autoindutora CSP é secretada para o meio extracelular pelo transportador ComAB e quando atinge um limiar de concentração, ativa o receptor ComD, que por sua vez fosforila a proteína ComE. Esta atua como um fator de transcrição para os operons *comCDE* e *comAB* e para o gene *comX*, resultando na produção do fator sigma ComX que regula os genes essenciais para a transformação.

### ***1.3 Formação de biofilme***

Como a competência em *Streptococcus pneumoniae* ocorre geralmente como resposta a situações de stress, por exemplo, a presença de antibióticos no meio e a ação do sistema imune do hospedeiro, há uma ligação direta desta com as doenças pneumocócicas (Burghout, Bootsma et al. 2007). Estudos revelam que a virulência em casos de seps e pneumonia pode ser modulada por CSP, bem como o desenvolvimento de biofilme em infecções causando meningite em modelos murinos (Trappetti, Gualdi et al. 2011).

A formação de biofilme é um mecanismo apresentado pelo pneumococo para evitar a fagocitose e o sistema complemento da defesa imunológica (Domenech, Ramos-Sevillano et al. 2013). Sua importância em doenças infecciosas crônicas é grande, sendo muito encontrado em casos de otite média que se desenvolvem para quadros mais graves de otorreia pós-timpanostômica (Allegrucci, Hu et al. 2006). Recentemente também foi constatada a presença de biofilme em infecções pulmonares; contudo sua formação e adesão ao epitélio do hospedeiro são dificultadas pela intensa tosse que esse tipo de infecção provoca nos pacientes (Trappetti, Gualdi et al. 2011, Vernatter and Pirofski 2013).

Bactérias presentes em biofilmes apresentam enormes diferenças no seu metabolismo, expressão gênica de virulência e produção de proteínas de adesão. Por estarem imersos em uma matriz extracelular e, assim, metabolicamente inertes, os pneumococos em biofilme são mais resistentes à ação de leucócitos e agentes antimicrobianos, servindo como uma fonte recalcitrante de bactéria em infecções persistentes (Lizcano, Chin et al. 2010).



## ***1.4 Nanobiotecnologia***

A nanobiotecnologia, uma nova área proveniente da biotecnologia clássica, é a ciência que desenvolve materiais em escala nanométrica para aplicação no campo farmacêutico e biológico. Nanomateriais orgânicos e inorgânicos têm sido amplamente estudados no campo de tratamento e diagnóstico de câncer (Zhu, Zhao et al. 2013), atividade antimicrobiana (Ravindran, Chandran et al. 2013, Rubilar, Rai et al. 2013) e alterações no processo de transformação bacteriana (Rojas-Chapana, Troszczyńska et al. 2005, Hollanda, Cury et al. 2011, Mattos, Alves et al. 2011).

Um destes nanomateriais atualmente em foco é o nanotubo de nitreto de boro, ou BNNT. Pela similaridade química do boro com o carbono, esta nanoestrutura termodinamicamente estável tem despertado muito interesse nos campos de bioengenharia, biomedicina e biotecnologia por apresentar menor citotoxicidade que nanotubos de carbono (Ciofani, Del Turco et al. 2012, Ciofani, Danti et al. 2013, Lancellotti M 2013). Dentre seus principais potenciais usos estão como nanocarreadores de drogas (Gao, Zhi et al. 2010) e nanotransdutores de sinais (Ciofani, Danti et al. 2013), além de seu possível acoplamento com outros materiais, como a hidroxiapatita, para aplicações em implantes odontológicos (Lahiri, Singh et al. 2011).

Outro nanomaterial que também vem sendo muito explorado são as nanopartículas de sílica mesoporosa, sistemas híbridos com poros de diâmetro mesoscópico de 2 a 50 nm monodispersos e ajustáveis em uma matriz inerte e biocompatível. A estrutura intrínseca de seus poros, junto com sua grande área de superfície, faz desta classe de material um ótimo modelo adsorvente para estudos envolvendo fenômenos de superfície (Hollanda, Cury et al. 2011). Dentre suas aplicações comprovadas estão próteses para a orelha média (Ehlert, Mueller et al. 2013), *delivery* de drogas (Shahbazi, Herranz et al.

2012, Shen, Ng et al. 2013) e funcionalização com outros materiais para fins de *imaging* intracelular e terapia de câncer (Zhang, Zhang et al. 2013).

Contudo, nanopartículas também podem ser encontradas em diferentes tipos de ambiente, como em atmosferas poluídas, e seus efeitos nocivos à saúde são pouco conhecidos. Estudos mostram que doenças infecciosas pulmonares causadas por bactérias são mais difíceis de serem tratadas em regiões onde o ar se encontra mais poluído (Romieu, Gouveia et al. 2012, Rylance, Gordon et al. 2013). Uma das hipóteses para explicar tal fenômeno seria uma influência positiva das nanopartículas para a aquisição de resistência em bactérias infectantes do trato respiratório, dentre elas *S. pneumoniae*.

### **1.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)**

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC, do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*) é muito utilizada para caracterizar a termodinâmica da interação de biomoléculas. Frequentemente é utilizada para estudar a ligação de pequenas moléculas, como fármacos e nanomateriais, a macromoléculas (DNA, proteínas etc.) a uma temperatura constante. Esta técnica pode determinar a constante de associação ( $K_a$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), a estequiometria da interação ( $\eta$ ), entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) (Jelesarov and Bosshard 1999, Pierce, Raman et al. 1999).

Uma das formas de utilizar a ITC consiste na adição do titulante, chamado de ligante e presente em uma seringa injetora automática, sobre o titulado presente na cela de amostra do calorímetro. A cada injeção de uma pequena alíquota do ligante, a interação entre as duas espécies leva a uma absorção ou liberação de calor, que é detectada e registrada na forma de um isoterma (Figura 3).

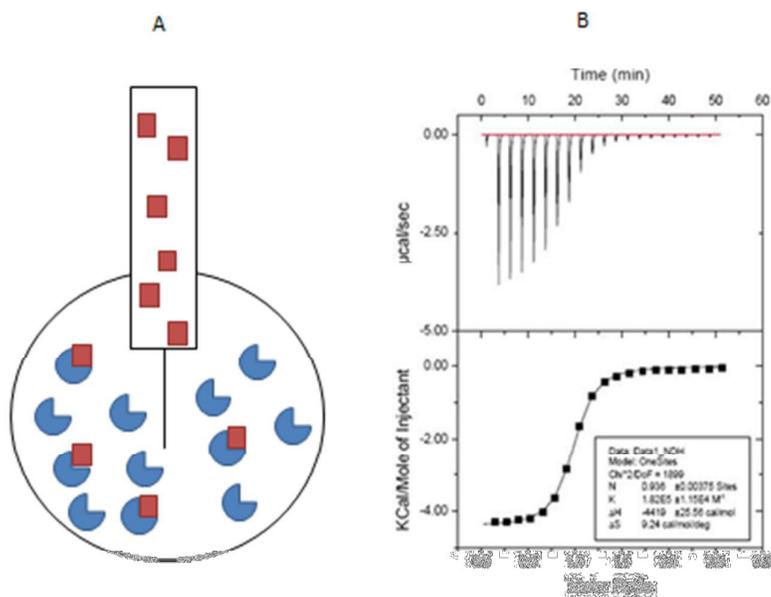


Figura 3 - A: Esquema representativo de uma seringa contendo a substância ligante e a cela da amostra de um calorímetro. B: Isoterma típica da interação de um ligante com uma macromolécula. Acima, dados não processados e abaixo, dados processados. Isoterma retirada de [http://www.bioch.ox.ac.uk/images/news/20100507-staunton/fig04\\_530px.png](http://www.bioch.ox.ac.uk/images/news/20100507-staunton/fig04_530px.png) (Acessado em 29 de junho de 2013)

Em cada injeção, o calor envolvido é proporcional às mudanças de concentração do ligante, conforme Equação 1:

Onde  $V$  é o volume da cela,  $\Delta H$  é a entalpia da interação e  $[\Delta L]$  a variação de concentração do ligante na cela.

A ITC determina diretamente através do experimento os valores da constante de afinidade ( $K_a$ ) e da entalpia. Este último valor é considerado aparente, uma vez que o experimento pode ter outras fontes de calor envolvidas que não apenas a interação ligante-receptor. Uma das causas que influencia o valor de  $\Delta H$  é a ionização do tampão quando há interação ou ligação entre ligante e receptor. Quando isso ocorre, seu valor é

corrigido para os efeitos de diluição (Ababou and Ladbury 2006). As entalpias determinadas experimentalmente são relacionadas com as forças moleculares (van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas) entre o ligante e o receptor, forças estas de suma importância para sistemas biológicos.

## 2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- Construir um vetor plasmidial de deleção do gene *luxS*, responsável pelo *quorum-sensing* da formação de biofilme em *Streptococcus pneumoniae*.
- Transformar o vetor plasmidial em cepas de *Streptococcus pneumoniae* para obter uma cepa mutante Pn360 $\Delta$ *luxS* spt<sup>f</sup>.
- Verificar a influência de nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto de boro na transformação de *Streptococcus pneumoniae*.
- Analisar de modo qualitativo a interação de nanotubos de nitreto de boro com DNA por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).

### **3 Material e métodos**

#### **3.1 Meios de cultura**

##### **Brain-heart infusion (BHI) caldo e 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).

##### **BHI sangue**

Após a esterilização de BHI Ágar, a uma temperatura de 40 °C foi adicionado 5% de Sangue Desfibrinado de Cavalo. Quando convinha, o meio era enriquecido com espectinomicina a 40µg/mL.

##### **Meio Luria-Bertani**

O meio Luria-Bertani foi preparado de acordo com protocolo estabelecido por Sambrook et al, nas seguintes proporções:

- Triptona – 10g
- Extrato de levedura – 5g
- NaCl – 10g
- Água q.s.p 1 litro

Para a preparação do meio Lúria-Bertani sólido, adicionou-se ágar para uma concentração final de 1,5%. O material foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

### **3.2 Linhagens bacterianas e condições de crescimento**

As cepas bacterianas utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1. As cepas de *Streptococcus pneumoniae* foram cultivadas em BHI sangue a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 18-24 horas. Para sua manutenção, as amostras foram estocadas em BHI caldo contendo 30% de glicerol a -80°C.

Tabela 1 - Linhagens de *Streptococcus pneumoniae* usadas neste trabalho

Linhagem	Características	Origem
Pn3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC	INCQS – FIOCRUZ
PnHC	<i>Streptococcus pneumoniae</i> isolado de um caso de pneumoniae	Hospital de Clínicas - UNICAMP
Pn360	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC	INCQS – FIOCRUZ
Pn360 $\Delta$ <i>luxS</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> com deleção do gene <i>luxS</i>	Laboratório de Biotecnologia – Universidade Estadual de Campinas

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

### **3.3 Síntese dos nanomateriais**

Ambos os nanomateriais foram sintetizados pelo Centro de Desenvolvimento em Energia Nuclear de Belo Horizonte/MG.

#### **3.3.1 Nanotubos de nitreto de boro**

Boro amorfo,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e hematita foram misturados e postos em um forno a  $550^\circ\text{C}$ , temperatura mantida constante por uma hora. Após, a temperatura foi aumentada até  $1300^\circ\text{C}$  com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , sob um fluxo de nitrogênio por uma hora. Em seguida, foi adicionado um fluxo de gás de amônia. O material obtido foi acondicionado a uma temperatura de  $950^\circ\text{C}$  por 5 horas sob um fluxo de nitrogênio. Os BNNT's foram purificados com solução de HCl a 3M a  $90^\circ\text{C}$  por 10 minutos e a amostra foi coletada por filtração e secada a  $40^\circ\text{C}$  (Ferreira 2011). Sua caracterização pode ser vista em Lancellotti et al., 2013. (Lancellotti M 2013).

#### **3.3.2 Nanopartículas de sílica mesoporosa**

A síntese de SBa-15 foi feita usando um copolímero tribloco Pluronic P123- $\text{PEO}_{20}\text{PPO}_{70}\text{-PEO}_{20}$  poli-[óxido de etileno]-poli[óxido de propileno]-poli[óxido de etileno] [ $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ ] (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 tetraetil ortosilicato. A mistura foi mantida a  $35^\circ\text{C}$  por 24 horas, e posteriormente por 1 dia à  $100^\circ\text{C}$  sob condições estáticas em uma autoclave revestida por teflon. O material obtido foi filtrado e secado a  $40^\circ\text{C}$  e o surfactante foi removido por calcinação por  $550^\circ\text{C}$  por 5 horas (Zhao, Feng et

al. 1998). As nanopartículas SBA-15 2x5 foram polimerizadas com poli(N-isopropilacrilamida) (P(N-iPAAm)) na proporção de 2 para 5.

O SBA-16 foi sintetizado sob condições ácidas em uma faixa de concentração de 3 à 5% de Pluronic F127-EO106PO70EO106 (EO<sub>106</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>106</sub>) 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 and Huirache-Acuna 2010). Sua caracterização pode ser vista em Hollanda et al., 2011. (Hollanda, Cury et al. 2011)

### **3.4 Metodologia da 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. O volume foi completado para 100 mL.

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

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

A extração do DNA genômico foi realizado de acordo com Sambrook et al, com algumas adaptações para bactérias gram-positivas. (Sambrook J 1989).

DNA genômico bacteriano foi isolado do crescimento de 18 horas de colônias de *S. pneumoniae* em ágar sangue incubado a 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Uma suspensão bacteriana em 400 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) com 50 µL de lisozima a 10 mg/mL foi incubada *overnight* também a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, foi adicionado à mistura 70 µL de 10% SDS e 5 µL de Proteinase K a 10

mg/mL. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl (0,8 g/L de brometo de cetramida e 0,4 g/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 750 µL 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 10000 g sendo o sobrenadante aquoso (600 mL) cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol a -20°C. A mistura foi mantida à temperatura de -20°C por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 10000 g 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 secado à temperatura ambiente e diluído com movimentos cuidadosos e circulares em 100 µL de água MiliQ esterilizada. 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.

### **3.5 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)**

A sequência do gene *luxS* (483 pb) foi obtida através do GenBank GI: 379070546 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)). Para amplificação do gene *luxS*, foi utilizado o DNA genômico da cepa Pn3 como molde, enquanto que para o cassete de resistência *ΩaaDa* (789 pb) foi utilizado o plasmídeo pLAN45, construído em trabalhos prévios do laboratório (Hollanda, Cury et al. 2011).

Os oligonucleotídeos usados como iniciadores estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados neste trabalho

Primer	Sequência	Descrição	Temperatura de Anelamento
LuxSPnF	GGATCCATGTCAAAGAAGTTATTGTCGAAAG	<i>luxS</i> forward	55°C
LuxSPnR	GGCATCATCTGAAATCCCTTGTCCAAGATG	<i>luxS</i> reverse	55°C
aaDA1	TGCCGTCACGCAACTGGTCCA	<i>ΩaaDA</i> forward	55°C
aaDA2	CAACTGATCTGCGCGGAGGC	<i>ΩaaDA</i> reverse	55°C

Para um volume final de 50  $\mu$ L de mistura de reação, contendo as especificações do fabricante da enzima Taq DNA Polimerase, foi adicionado 50 moles de cada oligonucleotídeo, 2  $\mu$ L do DNA template, solução tamponante da reação 10X na concentração final 1X acrescido de cloreto de magnésio 2 mM e 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Posteriormente, o tubo foi submetido à amplificação em termociclador (Gene Amp PCR System 9700), utilizando o seguinte ciclo:

95°C – 5’

92°C – 1’

55°C – 2’

72°C – 3’

72°C – 10’

4°C -  $\infty$

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 1D, 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.

### **3.6 Construção do vetor de mutação $\Delta luxS$**

3  $\mu\text{L}$  de fragmento do gene *luxS* amplificado foi inserido em 1  $\mu\text{L}$  do vetor de clonagem pGEMT® (Promega, USA) juntamente com 5  $\mu\text{L}$  do Tampão 2x e 1  $\mu\text{L}$  de DNA ligase. A ligação foi deixada *overnight* em geladeira para no dia seguinte ser transformado em *E. coli* competente JM109 (Sigma-Aldrich, USA). 200  $\mu\text{L}$  de JM109 foram transferidas para tubo eppendorf contendo o plasmídeo. Misturou-se delicadamente para em seguida ser incubado em gelo por 30 minutos. Logo após, foi realizado o choque térmico, no qual o tubo foi posto em banho-maria pré-aquecido a 42°C por exatos 90 segundos, sem agitá-lo no final. Em seguida, o tubo foi incubado em gelo por 1 a 2 minutos. Adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de LB líquido e a cultura foi incubada em estufa a 37°C por 1h30.

1 mL da célula competente transformada foi transferida para placas preparadas com o antibiótico apropriado [neste caso: placas LA + Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com 1 mL de LB + 30  $\mu\text{L}$  XGal (25mg/ml) + 10  $\mu\text{L}$  IPTG]. A placa foi estocada até todo o líquido ser absorvido, em seguida foi invertida e incubada a 37°C por 12 a 16 horas, até o aparecimento de colônias. Estas foram transferidas para outra placa LA + Amp e realizou-se o estoque das bactérias e a extração de seu plasmídeo, de acordo com o protocolo estabelecido por Sambrook (Sambrook J 1989).

Para tal, a solução de bactérias foi transferida para um eppendorf 1,5 mL, que foi cheio até a borda. Centrifugou-se a 4000 g na microcentrífuga por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado. O pellet foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de Solução I gelada; logo após foi mantido no gelo por 30 minutos. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de Solução II. Misturou-se por inversão suave e vagarosa. Incubou-se no gelo por no máximo 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  da Solução III. Misturou-se por inversão suave e o tubo foi incubado no gelo por 15 minutos. Logo após, centrifugou-se a 10000 g por 5 a 10

minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo. 1 mL de etanol absoluto foi adicionado; misturou-se por inversão e incubou-se a  $-85^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos a 12000 rpm. O etanol foi descartado e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. O pellet foi ressuscitado e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco. O DNA foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O plasmídeo resultante contendo o gene *luxS* foi então digerido com a enzima de restrição BamHI, uma vez que o fragmento amplificado possui um sítio de restrição na sua extremidade 5'. Com o plasmídeo linearizado, foi inserido o cassete de resistência a espectinomicina *ΩaaDa* seguindo o protocolo de ligação já descrito. A nova construção foi clonada também seguindo o protocolo de transformação, plaqueada em meio LA + Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Spt e novamente foi feito um estoque da construção resultante.

Todas as inserções foram verificadas por PCR dos genes com seus respectivos *primers* e eletroforese de gel de agarose a 1,8%. Também se analisou a posição da inserção do cassete *aaDa* em relação ao gene *luxS*, isto é, se foi inserido em posição correta ou de maneira invertida. Para tal, foi feito um PCR usando os *primers* *ΩaaDa forward* e *luxS reverse* para a verificação da posição correta e outra com os *primers* *ΩaaDa reverse* e *luxS reverse* para a posição invertida.

A concentração do estoque da construção final foi analisada por NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

### **Solução I**

- 50 mM glucose
- 25 mM Tris HCl pH 8,0

- 10 mM EDTA pH 8,0

A solução foi autoclavada por 15 minutos e, em seguida, mantida a 4 °C.

### **Solução II**

- NaOH 0,2N
- SDS 1%

A solução foi preparada somente no momento do uso.

### **Solução III**

- Acetato de Potássio 5 M      60ml
- Ácido Acético Glacial      11,5 ml
- H<sub>2</sub>O                              28,5 ml

A solução foi estocada a 4 °C.

### ***3.7 Transformação de *Streptococcus pneumoniae* com o vetor de mutação $\Delta luxS$***

A transformação foi realizada com as cepas Pn3, PnHC e Pn360 de acordo com Pozzi et al, com o objetivo de verificar qual cepa seria a melhor transformante (Pozzi, Masala et al. 1996). As bactérias crescidas foram transferidas com a utilização de uma alça estéril para o meio BHI caldo, que foram incubadas em estufa a 37°C até atingir uma densidade ótica de  $C_{600} = 1,0$ , correspondente a  $10^8$  UFC/mL (Prescott 2002). Dez minutos antes de ser feita a transformação, foi adicionado CSP-1 (Aminotech, Brasil) a uma concentração de 150 ng/mL. A transformação foi realizada em seguida usando 100  $\mu$ L da solução bacteriana incubada com 2  $\mu$ L de plasmídeo a uma concentração de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Posteriormente, 1000  $\mu$ L de meio BHI caldo foi adicionado e a bactéria foi encubada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas. Depois, 100  $\mu$ L da alíquota foi transferida para placas de BHI ágar sangue com 2  $\mu$ g/mL de espectinomicina (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e as bactérias foram incubadas por 18 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Algumas colônias foram escolhidas aleatoriamente para extrair seu DNA. A verificação da inserção efetiva do cassete foi feita utilizando os *primers aaDAF* e *luxSR*.

### ***3.8 Ensaio do efeito das nanopartículas na transformação de *Streptococcus pneumoniae****

O ensaio de transformação foi realizado de acordo com Pozzi et al (Pozzi, Masala et al. 1996), com algumas modificações. A transformação foi realizada com 500  $\mu$ L da cepa Pn360 selvagem em concentração de  $10^8$  UFC/mL, utilizando 2  $\mu$ L de material genético extraído a partir da cepa mutada Pn360 $\Delta luxS$  a 440,7 ng/ $\mu$ L (leitura feita por nanodrop) e 30  $\mu$ L das nanopartículas, em concentração de 1 mg/mL. Em uma análise posterior,

também foram realizados outros ensaios com quantidades de nanomateriais de 50 e 100  $\mu\text{L}$ , na mesma concentração supracitada.

Também foi realizado controle negativo sem as nanopartículas em questão, para fins comparativos. As amostras foram plaqueadas após 4 horas e incubadas na estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. O número de UFC transformadas foi verificado por contagem e a análise estatística foi realizada comparando o número de transformantes obtidos com o uso de nanopartículas pelo número de transformantes obtidos no controle negativo. A verificação da aquisição do gene foi feita por PCR sob as mesmas condições descritas na obtenção de amostras.

### ***3.9 Preparação dos nanotubos de nitreto de boro para análise por ITC***

A partir de uma suspensão contendo 10 mg/mL de nanotubo de nitreto de boro, foi retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{g}$  de BNNT) e transferida para 1 mL de água destilada em um eppendorf. Esta mistura foi sonicada por 4 horas e meia e posta para repouso *overnight* para a decantação das partículas que não foram suspensas na água. A suspensão final apresentou uma molaridade aproximada de 0.2 mM.

### ***3.10 Análise da interação de DNA com BNNT por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)***

As análises de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foram realizadas utilizando o equipamento MicroCal™ ITC200 System (GE Healthcare, USA) no Laboratório de Termodinâmica e Engenharia de Processos de Separação da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A fim de verificar a calibração e limpeza do equipamento, foi realizada uma corrida de titulação água em água. Preencheu-se a cela de amostra com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada previamente desgaseificada e titulou-se a mesma amostra de água na cela. Logo após, foram feitas as seguintes análises (Tabela 3):

Tabela 3 - Amostras analisadas por ITC. As molaridades são dadas em mM.

Amostra na cela	Ligante	Molaridade cela	Molaridade ligante	Amostra na cela	Ligante	Molaridade cela	Molaridade ligante
BNNT	ATP	0,2	1,5	BNNT	GTP	0,2	1,5
Água	ATP	0,2	1,5	Água	GTP	0,2	1,5
BNNT	CTP	0,2	1,5	BNNT	glnA2	0,2	0,1
Água	CTP	0,2	1,5	Água	glnA2	0,2	0,1
BNNT	TTP	0,2	1,5	BNNT	pLUC	0,2	0,0026
Água	TTP	0,2	1,5	Água	pLUC	0,2	0,0026

Foram analisadas as interações de BNNT com os quatro deoxinucleotídeos trifosfatados: ATP, CTP, GTP e TTP (Promega, USA), com um oligonucleotídeo glnA2 e com um plasmídeo pGEM®-luc (Promega, USA). Todos os ligantes estavam diluídos em água destilada.

Estes ligantes também foram titulados em cela de amostra contendo apenas água destilada, para poder descontar suas possíveis interações.

Todas as análises foram realizadas a uma temperatura de 37°C para mimetizar sistemas biológicos. A linha de base foi estabelecida a 10  $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$  e rotação de 1000 rpm. Foram feitas 25 injeções do ligante de 1,5  $\mu\text{L}$ , com duração de 3 segundos e intervalo de 180 segundos entre cada uma. Os isotermas foram processados com o programa MicroCal OriginPro.

### ***3.11 Análise da interação de DNA com nanotubo de nitreto de boro por eletroforese de retardo***

O ensaio foi realizado de acordo com protocolo estabelecido por Suwalski et al. (Suwalski, Dabboue et al. 2010).

pDNA e BNNT foram misturados em 50  $\mu\text{L}$  de HEPES 10 mM pH = 7,4 nas seguintes proporções (ng pDNA/ng BNNT): 2/0,6 – 2/1,25 – 2/2,5 – 2/5. Como controle negativo, utilizou-se pDNA puro.

A eletroforese foi corrida em gel de agarose a 2% a 100V contendo 0,6% de brometo de etídeo. O gel foi fotografado pelo sistema GelDoc It – Imaging System, com filtro vermelho utilizando-se o software VisionWorks ©LS.

### ***3.12 Análise estatística***

A análise estatística do ensaio de transformação foi realizada no programa GraphPad InStat por Análise de Variância Simples (teste de Tukey entre o número de UFC transformadas com e sem o uso de nanopartículas de sílica mesoporosa e nanotubos de nitreto de boro). Os valores de p considerados para a taxa de transformação foram  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Construção do vetor plasmidial $\Delta luxS$

O gene *luxS* foi amplificado de acordo com a metodologia anteriormente citada. A sua inserção no pGEMT® (Promega) e posterior clonagem em células competentes JM109 foi verificada por PCR do gene com os *primers* correspondentes e eletroforese com gel de agarose a 1,8% a partir do plasmídeo extraído em pequena escala (mini-prep). O fragmento encontrou-se na altura de 500pb, correspondente ao tamanho do gene em questão (483pb).

Em seguida, no plasmídeo cortado com a enzima de restrição BamHI foi inserido o cassette de resistência a espectinomicina, *aaDa*. Novamente, a construção foi clonada com sucesso em células competentes JM109 e verificada por PCR com os *primers* do cassette *aaDa*. A sua banda se deu na altura de 800pb, o que corresponde ao tamanho do cassette (789 pb).

O PCR feito com os *primers* *QaaDa forward* e *luxS reverse* apresentou um fragmento bem acentuado na altura de 1,3kb, enquanto a eletroforese das amostras resultantes do PCR utilizando os *primers* *QaaDa reverse* e *luxS reverse* não apresentou fragmento definido nesta altura. Isto mostra que o cassette de resistência a espectinomicina foi inserido no plasmídeo na posição correta, correspondente às fitas *sense* e *antisense* do plasmídeo em relação ao gene *luxS* (Figura 4).

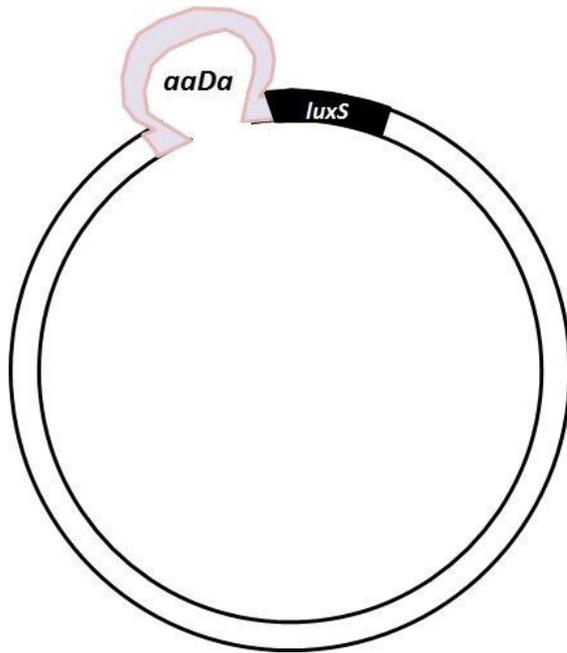


Figura 4 - Representação esquemática da inserção do cassete de resistência *aaDa* em relação ao gene *luxS*

#### 4.2 *Transformação de Streptococcus pneumoniae com o vetor de mutação $\Delta luxS$*

A transformação foi realizada com as cepas Pn3, PnHC e Pn360, de acordo com o protocolo citado.

A análise de efetivação da recombinação homóloga feita por PCR utilizando os *primers* demonstraram que uma das colônias tiveram o cassete *aaDa* introduzido no material genômico. Deste modo foi feito estoque da colônia mutante denominada Pn360 $\Delta luxS$ , resistente à espectinomicina. Esta também teve seu DNA genômico extraído para ser utilizado em ensaios de transformação envolvendo as nanopartículas, uma vez que a taxa de recombinação homóloga é maior quando o material genético doador é genômico ao invés de plasmidial (Ejsmont, Ahlfeld et al. 2011).

O esquema completo da construção do vetor plasmidial e sua transformação em *S. pneumoniae*, gerando a cepa mutante, é ilustrado pela Figura 5.

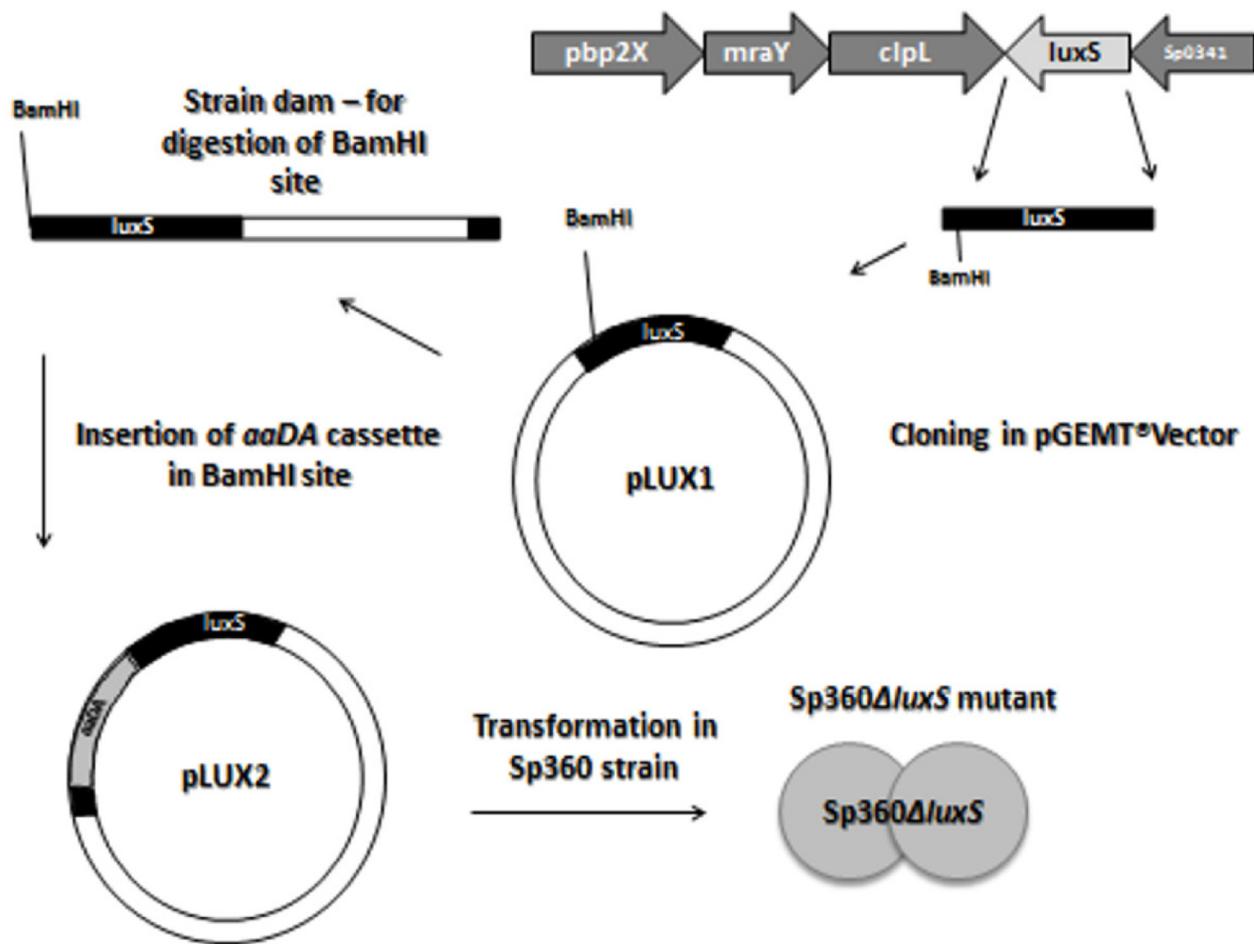


Figura 5 - Esquema da construção do vetor plasmidial pLUX2 e sua transformação em *S. pneumoniae*, gerando um mutante resistente à espectinomicina

### 4.3 Ensaio de transformação de *Streptococcus pneumoniae* com nanopartículas

#### Efeito das nanoestruturas na transformação de *S. pneumoniae*

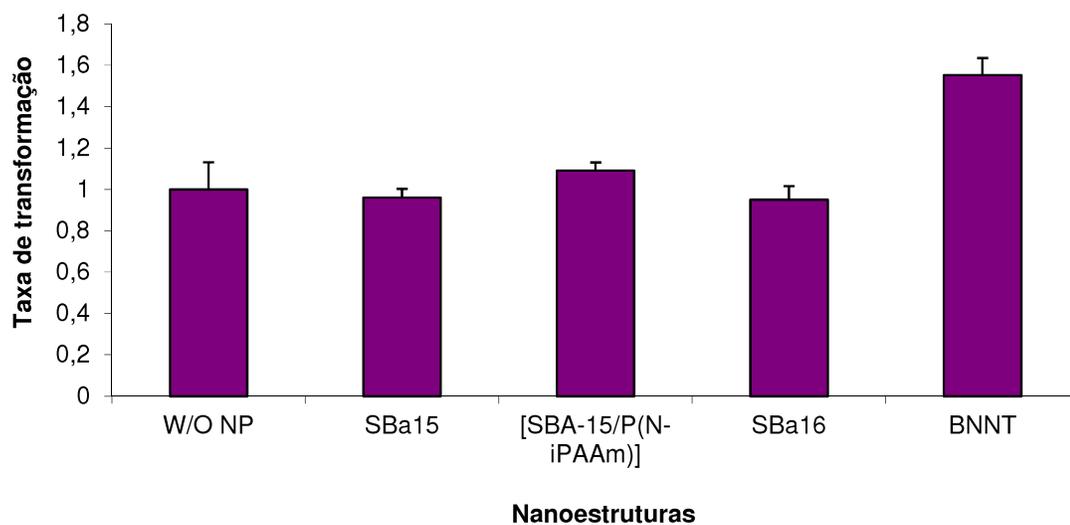


Figura 6 - Taxa de transformação de *S. pneumoniae* em contato com 30 µg de nanoestruturas

Tabela 4 - valores obtidos de UFC na transformação de Pn360 em contato com as nanoestruturas

	Média das UFC transformantes obtidas em $10^8$ UFC	Razão (média obtida em contato com nanoestruturas/Média do controle negativo)	Valores de p (Análise de Variância Simples)
<b>w/o NP (controle negativo)</b>	101 ± 17	1,00 ± 0,17	-
<b>SBa15</b>	98 ± 23	0,96 ± 0,06	0.3125
<b>[SBA-15/P(N-iPAAm)]</b>	110 ± 21	1,09 ± 0,05	0.2255
<b>SBa16</b>	97 ± 26	0,95 ± 0,09	0.2508
<b>BNNT</b>	158 ± 39	1,55 ± 0,12	0.0060 (**)

Antes de ser realizado o ensaio de transformação com as nanopartículas, foi testada a capacidade de transformação de três cepas distintas de *Streptococcus pneumoniae*: Pn3, PnHC e Pn360. A cepa que apresentou maior facilidade para ser transformada foi Pn360, além de facilitar a contagem de UFC transformadas por apresentar cápsulas menores em relação às demais cepas e não haver sobreposição destas quando em crescimento. Esta cepa foi, portanto, escolhida como bactéria receptora do material genético para este ensaio.

A Tabela 4 mostra os valores de UFC transformadas com e sem a presença da quantidade constante de 30 µg de nanoestruturas no meio, enquanto o gráfico da Figura 6 ilustra as diferenças nas taxas de transformação. As médias das nanopartículas de sílica mesoporosa 15, 15 2x5 e 16 apresentaram valores de  $p$  superiores a 0.05. Deste modo, a concentração pré-estabelecida de 30 µg de nanopartículas de sílica mesoporosa não influenciou na taxa de transformação de *Streptococcus pneumoniae*.

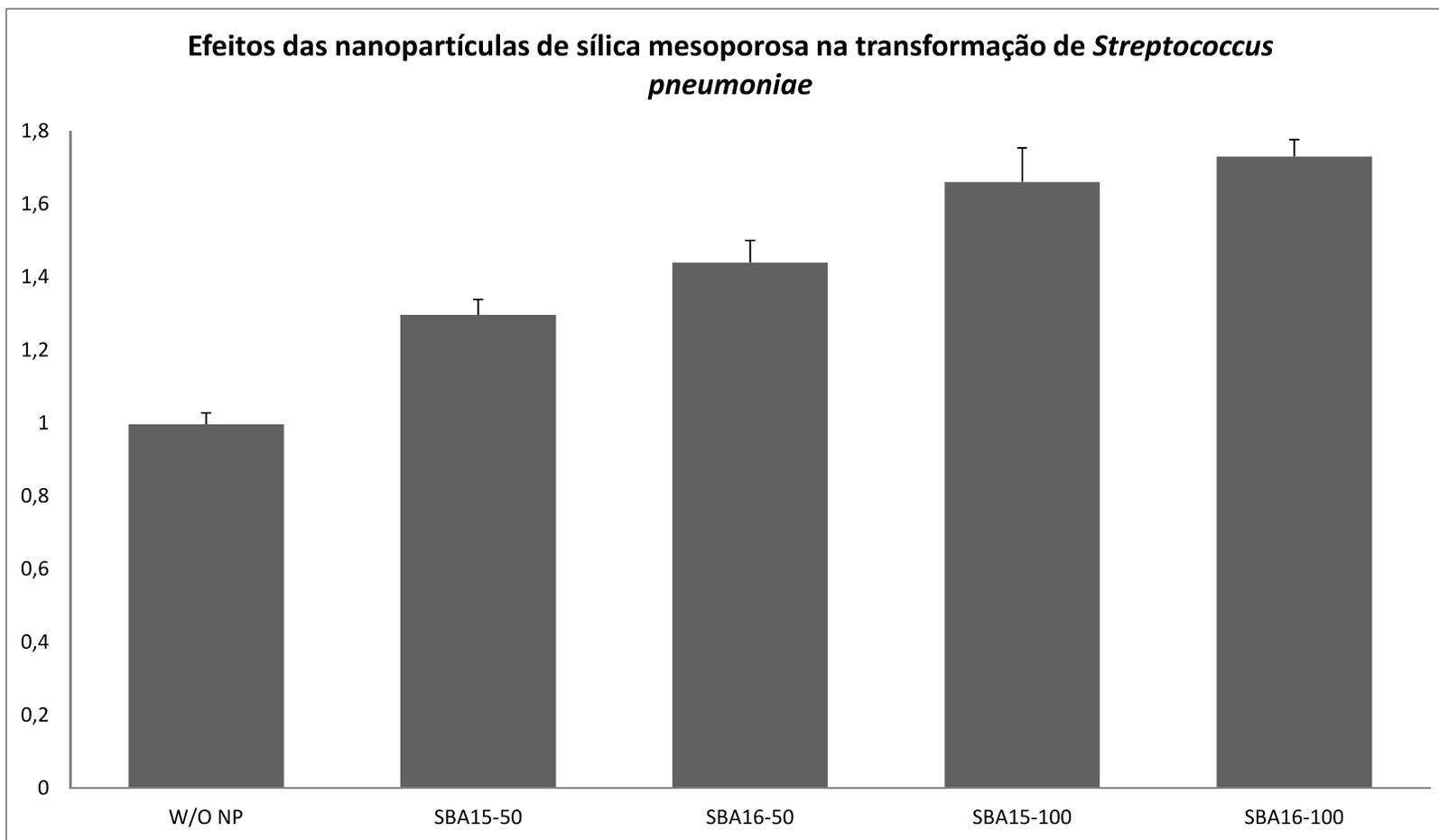
Hollanda et. al descreveu um aumento na taxa de transformação em duas cepas distintas de *Neisseria meningitidis* utilizando as mesmas nanopartículas de sílica mesoporosa (Hollanda, Cury et al. 2011). Uma das hipóteses levantadas para tal observação foi a complexação do nanomaterial com DNase bacteriana, levando ao impedimento de degradação do material genético exógeno pelas enzimas e facilitando sua entrada na bactéria.

Contudo, ambos os microrganismos não podem ser diretamente comparados, uma vez que as bactérias gram-positivas, como é o caso de *Streptococcus pneumoniae*, secretam uma maior quantidade de DNase no meio próximo em relação às bactérias gram-negativas (Dubnau 1999). Como a quantidade de nanopartículas de sílica postas em contato com as bactérias a serem transformadas em ambos os trabalhos foi a mesma de 30 µg, uma explicação plausível, porém hipotética, para o não aumento na taxa de

transformação em *S. pneumoniae* é justamente a diferença de concentração de DNase secretadas pelas bactérias no meio. A quantidade de nanopartículas de sílica não seria suficiente para complexar com toda a DNase presente e, deste modo, não seria capaz de facilitar a entrada do material genômico íntegro para o meio intracelular bacteriano. A fim de se comprovar a tal hipótese levantada, foram realizados novamente os testes de transformação em presença das nanopartículas de sílica mesoporosa pura SBa15 e SBa16, desta vez em maiores quantidades de 50 e 100 µg. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 7 e Tabela 5.

Como pode ser observado, com o aumento da quantidade de nanopartículas colocada em contato com as bactérias durante o processo de transformação em relação ao experimento anterior, obteve-se um aumento significativo de colônias transformantes. Os valores de p resultantes do teste estatístico foram considerados significativos para as transformações contendo 50 µg de SBa15 e SBa16 e 100 µg de SBa15, enquanto que com a adição de 100 µg de SBa16, o valor de p mostrou-se extremamente significativo. Este ensaio de transformação de pneumococo na presença de quantidades maiores de nanopartículas de sílica mesoporosa corrobora com a hipótese levantada da complexação deste material com a enzima DNase, levando à sua inativação para degradar materiais genéticos de origem exógena. Uma vez que nanopartículas de sílica são facilmente encontradas em alta concentração na atmosfera de ambientes áridos e em regiões poluídas, os resultados obtidos são alarmantes para questões de saúde pública, uma vez que sua presença pode facilitar a modificação genética de bactérias patogênicas relacionadas a infecções respiratórias, dificultando assim o seu tratamento (Ribeiro 2002, Romieu, Gouveia et al. 2012). Mesmo que a quantidade de nanopartículas de sílica mesoporosa requerida para obter um aumento na taxa de transformação *in vitro* em *S. pneumoniae* seja maior que aquela para *Neisseria meningitidis*, a sua presença

pode ser ligada ao aparecimento de doenças pulmonares mais agressivas (Remond, Ralph et al. 2010).



**Figura 7** –Taxa de transformação de *S. pneumoniae* em contato com 50 e 100 µg de nanopartículas de sílica mesoporosa SBA15 e SBA16

**Tabela 5** - valores obtidos de UFC na transformação de Pn360 em contato com as nanoestruturas . Os valores de p estatisticamente significativos e extremamente significativos estão identificados por (\*) e (\*\*\*), respectivamente.

	<b>Média das UFC transformantes obtidas em 10<sup>8</sup> UFC</b>	<b>Razão (média obtida em contato com nanoestruturas/Média do controle negativo)</b>	<b>Valores de p (Análise de Variância Simples)</b>
<b>w/o NP (controle negativo)</b>	104 ± 5	1,00 ± 0,13	-
<b>SBa15-50</b>	135 ± 7	1.29 ± 0,06	0.0312 (*)
<b>SBa16-50</b>	150 ± 9	1,44 ± 0,08	0.0153 (*)
<b>SBa15-100</b>	173 ± 14	1,66 ± 0,13	0.0218 (*)
<b>SBa16-100</b>	180 ± 8	1,73 ± 0,06	0.0006 (***)

Em relação às taxas de transformação obtidas com a presença de nanopartículas de nitreto de boro, o p resultante pela análise estatística foi de 0.006, podendo ser considerado estatisticamente muito significativo ao nível de 5%. Conforme já elucidado, os nanotubos de nitreto de boro despertaram muita atenção devido à similaridade química destes elementos com carbono, podendo ser uma alternativa para o uso de nanotubos de carbono, considerados altamente citotóxicos (Manshian, Jenkins et al. 2013).

Mattos et al. verificou o efeito positivo de nanotubos de carbono (SWCNT) na taxa de transformação de *Neisseria meningitidis* e através de Espectroscopia Raman indicou uma interação do DNA bacteriano com estas nanoestruturas, de modo a protegê-lo da ação de DNAses (Mattos, Alves et al. 2011). Pela similaridade estrutural e química entre os nanotubos de carbono e nanotubos de nitreto de boro, era esperado um comportamento semelhante para as taxas de transformação em *S. pneumoniae* utilizando esta última nanoestrutura e de fato os resultados no ensaio de transformação corresponderam a tal expectativa. Esta difere da interação proposta para as nanopartículas de sílica mesoporosa e deste modo a maior quantidade de DNase liberada pelo pneumococo em relação ao meningococo não teria influência no processo de transformação, uma vez que o DNA estaria protegido de sua ação pelos nanotubos.

A facilitação que nanopartículas proporcionam na transformação bacteriana preocupa principalmente em regiões nas quais a atmosfera se apresenta poluída, uma vez que as infecções pulmonares bacterianas se mostram mais resistentes ao tratamento com antibióticos. O boro é um dos principais elementos presentes na fabricação de vidros, cerâmicas e indústrias metalúrgicas (Kaur, Pandey et al. 2013) e a concentração de micro- e nanopartículas em ambientes ao redor de fábricas e indústrias destes produtos é

alta. Os indícios de que nanopartículas derivadas do boro causam aumento na taxa de transformação bacteriana reforça a necessidade de precaução dos trabalhadores destes tipos de fábricas para evitar a exposição direta de inalação do ar com a utilização de equipamentos de proteção individual no ambiente de trabalho, principalmente máscaras de proteção respiratória.

Ainda assim, a hipótese de interação de BNNT com material genético e consequente proteção de sua degradação por enzimas desperta atenção pelo seu potencial uso como carreadores em terapia gênica. Novamente, o material análogo feito de átomos de carbono já tem mostrado resultados como sistema de *delivery* de siRNA em tratamento de câncer (Neagoe, Braicu et al. 2012). Deste modo, a constatação de interação entre ambos os sistemas fez-se necessário.

#### ***4.4 Análise da interação de DNA com BNNT por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)***

Para observar o comportamento de BNNT com material genético, analisou-se primeiramente sua interação com nucleotídeos separadamente, para após realizar ensaios com sequências maiores.

Os dados de ITC tratados e não tratados para cada nucleotídeo podem ser vistos nas figuras seguintes (Figuras 8 a 11).

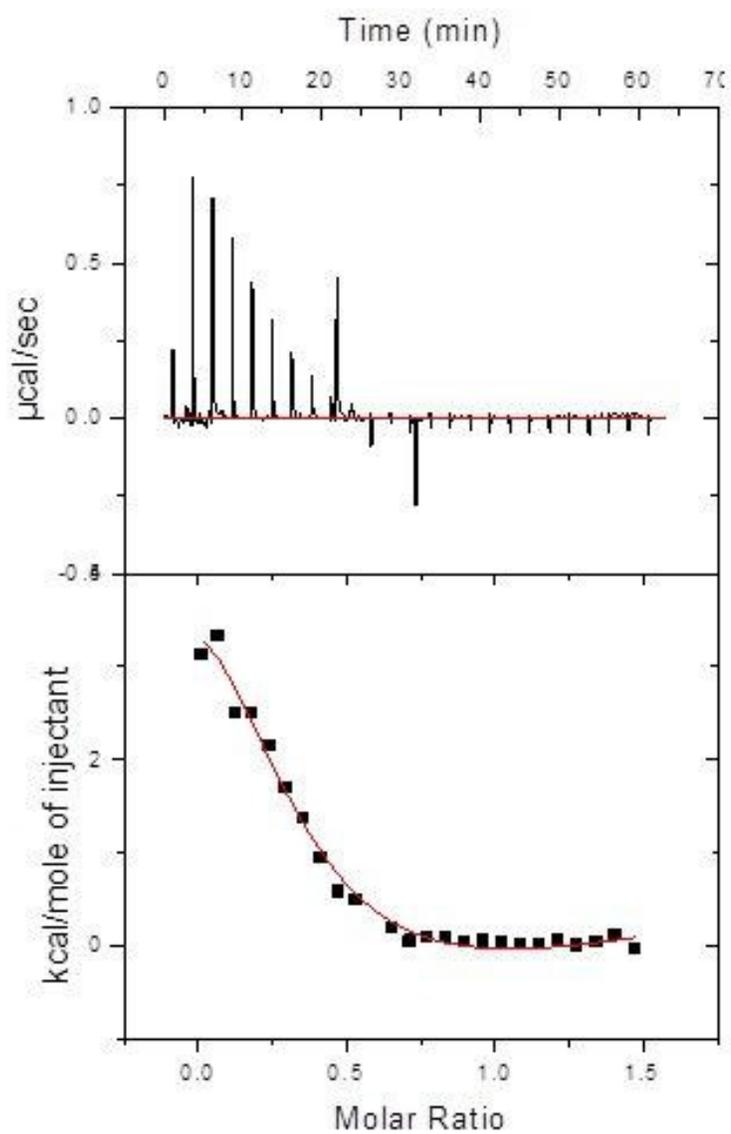


Figura 8 - Isoterma não tratada (acima, à esquerda) e tratada (abaixo, à esquerda) da interação de ATP com BNNT.

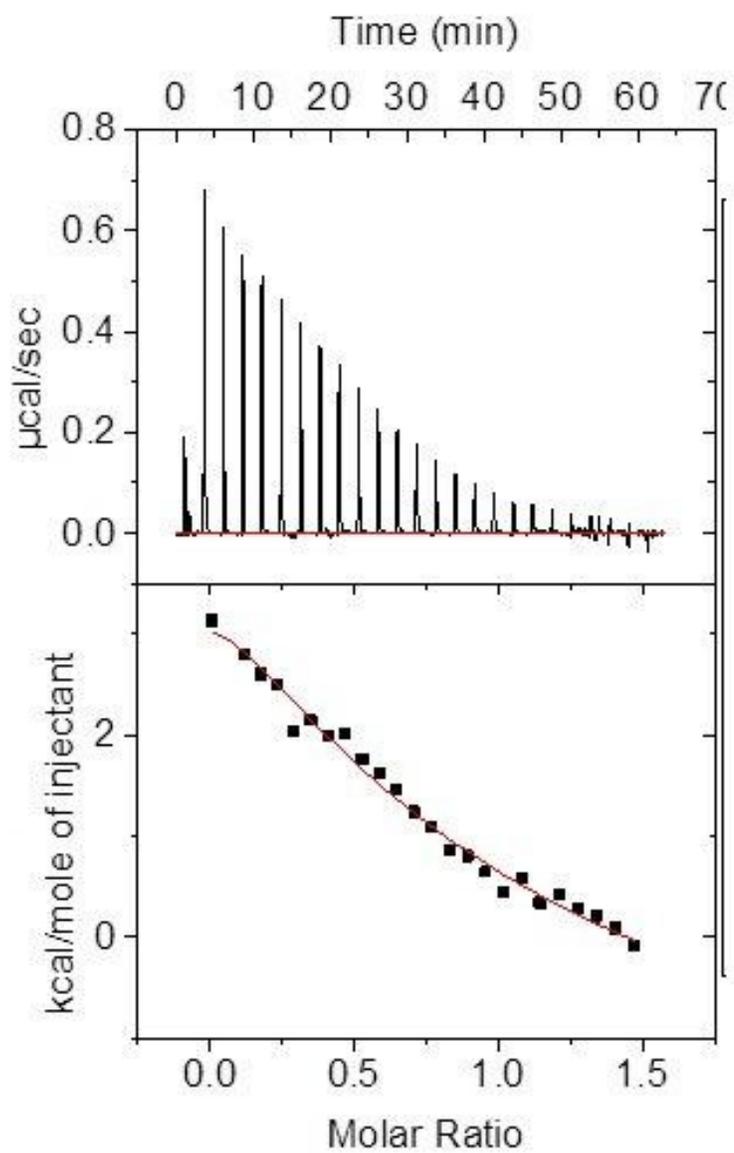


Figura 9 - Isotherma não tratada (acima, à esquerda) e tratada (abaixo, à esquerda) da interação de CTP com BNNT.

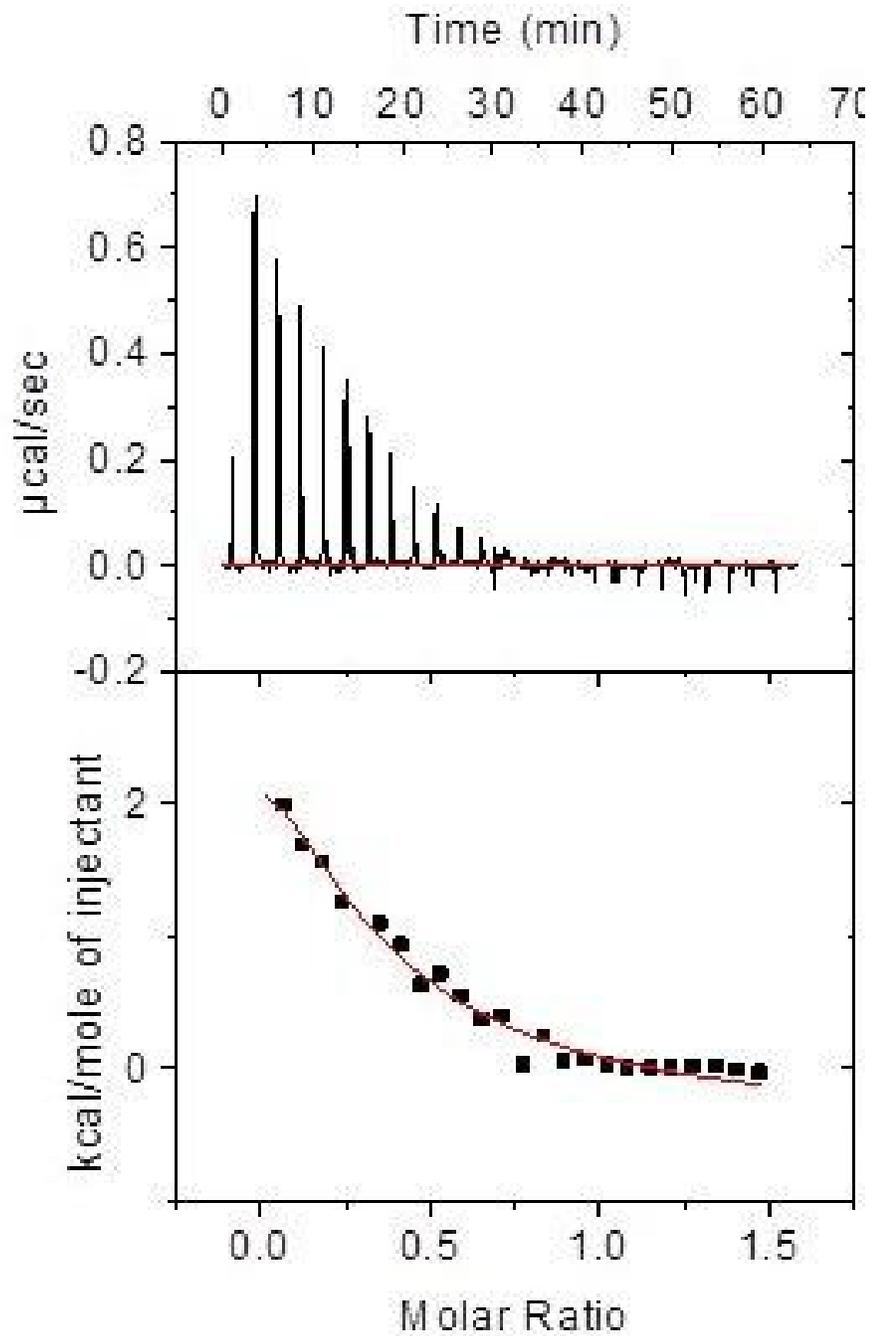


Figura 10 - Isoterma não tratada (acima, à esquerda) e tratada (abaixo, à esquerda) da interação de TTP com BNNT. À direita, dados do coeficiente de equilíbrio, entalpia e entropia.

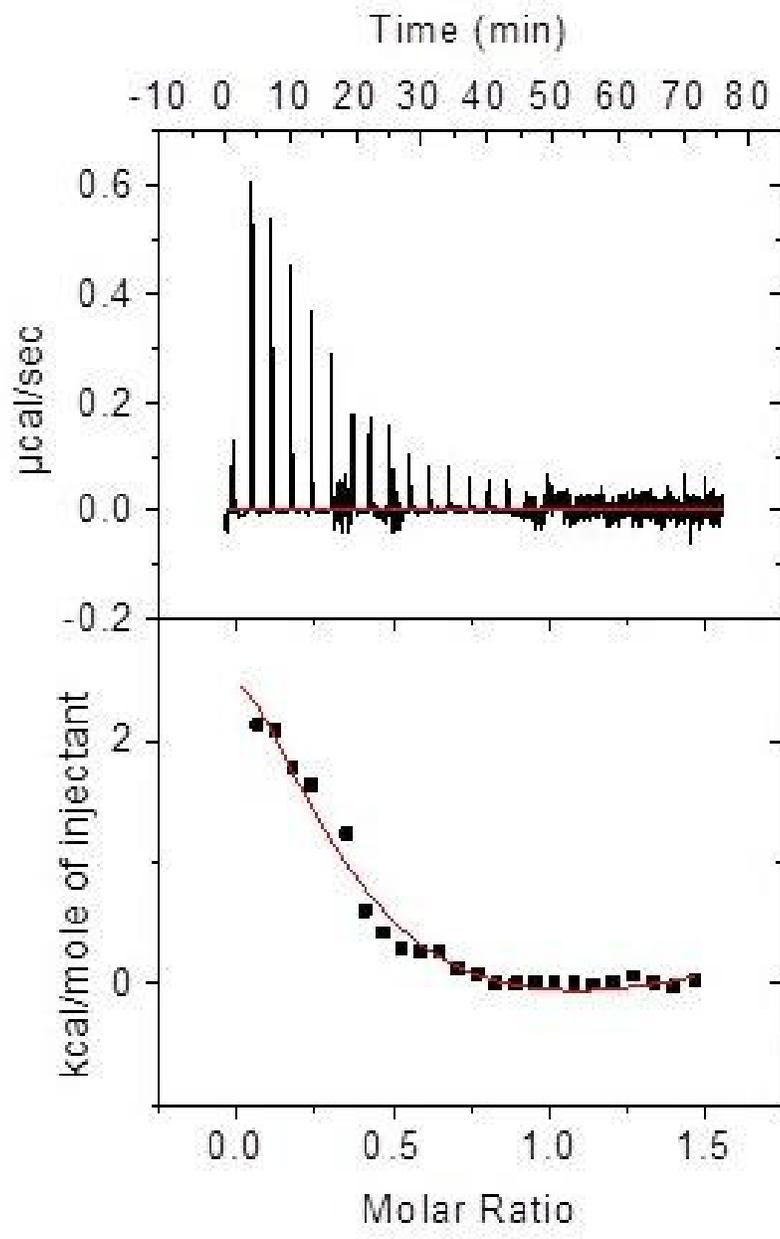


Figura 11 - Isoterma não tratada (acima, à esquerda) e tratada (abaixo, à esquerda) da interação de GTP com BNNT. À direita, dados do coeficiente de equilíbrio, entalpia e entropia.

Para todas as análises, foi realizada uma titulação do respectivo ligante (nucleotídeo, oligonucleotídeo e plasmídeo) em água, para se descontar o calor de diluições destes no solvente. Todas as isotermas tiveram os valores dos brancos subtraídos para se obter as curvas e valores apenas referentes às interações dos materiais genéticos com BNNT.

A fim de se analisar dados de ITC para parâmetros termodinâmicos relevantes, é necessário escolher um modelo de ligação entre as moléculas, isto é, definir se há apenas um sítio de ligação (ou  $n$  sítios idênticos), dois sítios independentes ou ligações sequenciais (Lewis 2008). Uma vez que o comportamento de interação entre BNNT e nucleotídeos é desconhecido, verificou-se para qual dos modelos os dados melhor se ajustariam, levando-se em consideração os erros experimentais esperados. O modelo gerado pelo software de análise de ITC acusa a existência de três ligações sequenciais independentes, o que significa que três nucleotídeos se ligam a cada nanotubo de nitreto de boro sem que haja competição pelo mesmo sítio de ligação. Entretanto, os ajustes numéricos do software resultaram em valores de entalpia cujo grau de incerteza é até duas vezes o valor absoluto dessa grandeza, portanto esses resultados são inconclusivos para se definir um comportamento global em termos de energia de interação dos sítios. De todo o modo, a ideia de se analisar a interação de DNA com BNNT por ITC tem escopo inteiramente qualitativo e a quantificação do sistema não se mostra relevante neste momento.

Observa-se que para cada injeção do ligante na cela de amostra os picos da linha base de calor oscilam positivamente, indicando que o processo da interação de nanotubos de nitreto de boro com os nucleotídeos trifosfatados foi endotérmico, ou seja, com absorção de energia no sistema.

Idealmente, a isoterma deveria ter formato sigmoidal para a ligação poder ser considerada efetiva. Contudo, o formato característico obtido já foi verificado em análises de nucleotídeos com outros tipos de nanopartículas similares. A explicação é a baixa solubilidade destas últimas em água, impedindo que se forme a parte inicial do platô da sigmoide (Anindya Das 2008, Varghese, Mogera et al. 2009).

Nestes experimentos anteriores realizados com nanomateriais e nucleotídeos (Anindya Das 2008, Varghese, Mogera et al. 2009), destes foi exotérmica, diferindo daquela medida com BNNT. Contudo, o fato da interação ser exo- ou endotérmica é característico de cada ligante-macromolécula. A ordem da energia de interação entre nucleotídeos e nanopartículas de carbono (nanotubos de carbono e grafeno) obtida experimentalmente se mostrou em ambos os sistemas sendo em ordem decrescente de  $T > A > C$ . Os autores alegam não ter sido possível analisar a interação dos nanomateriais com guanina devido a sua baixa solubilidade deste em água. Neste trabalho, as análises foram realizadas com bases trifosfatadas, contornando assim o problema da solubilidade. Curiosamente, o sistema nucleotídeo-BNNT apresenta a ordem dos valores de entalpia invertida em relação aos demais sistemas similares, sendo  $C > A > T \approx G$ . Provavelmente esta inversão se dá pelo fato da interação ser endotérmica.

Após as análises com os nucleotídeos separados, verificou-se o comportamento de BNNT frente a sistemas mais complexos com cadeias de nucleotídeos, com o oligonucleotídeo *glnA2* e o plasmídeo pLUC. Os resultados para estes sistemas podem ser vistos nas figuras 12 e 13, respectivamente.

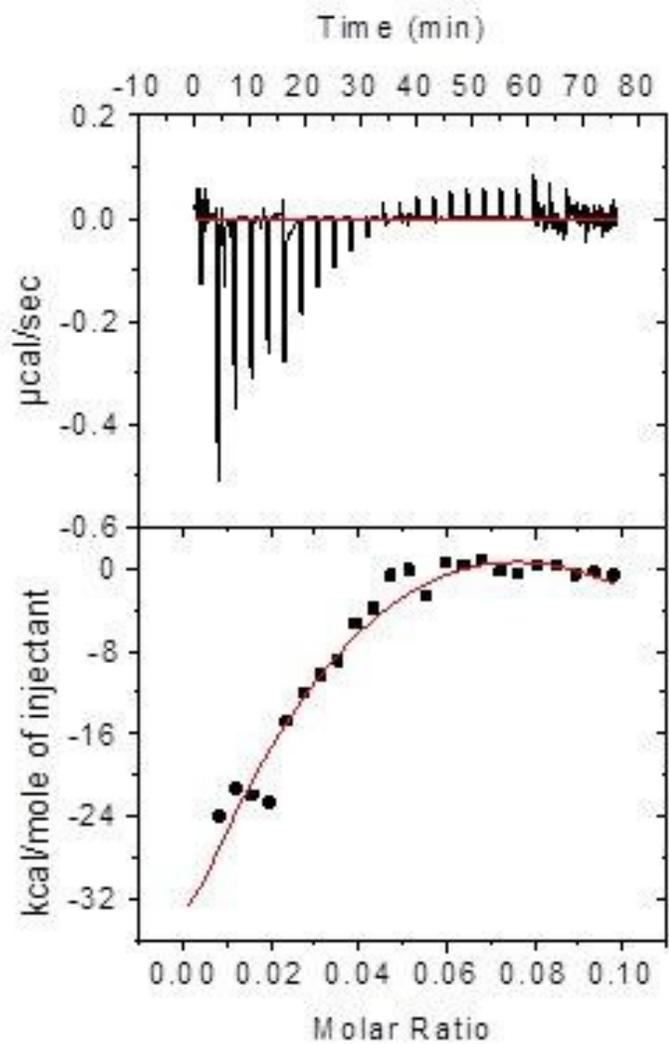


Figura 12 - Isotherma não tratada (acima, à esquerda) e tratada (abaixo, à esquerda) da interação do oligonucleotídeo *glnA2* com BNNT.

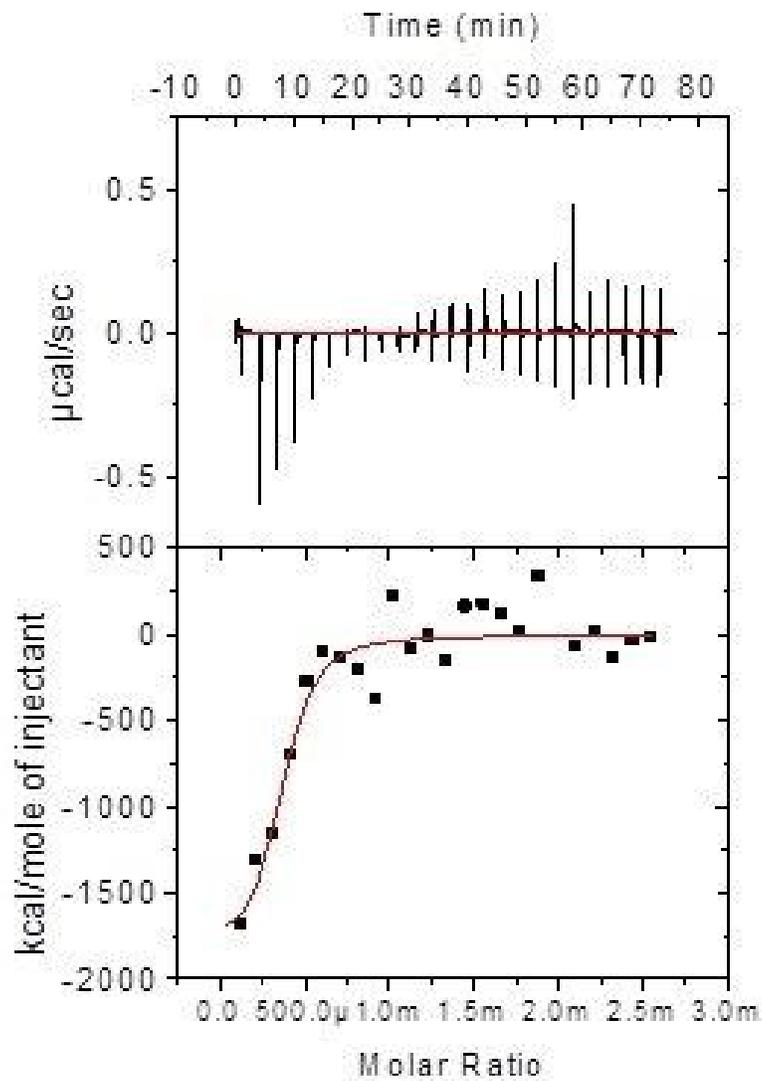


Figura 13 - Isotherma não tratada (acima, à esquerda) e tratada (abaixo, à esquerda) da interação do plasmídeo pLUC com BNNT.

Tanto o oligonucleotídeo *glnA2* e o plasmídeo pLUC foram escolhidos de forma aleatória para este experimento, apenas para se observar o comportamento das nanopartículas frente a este tipo de moléculas. O modelo que melhor se ajusta para explicar o comportamento de interação de *glnA2* com BNNT também foi o de três ligações independentes sequenciais, tal como para os nucleotídeos trifosfatados. Em relação ao modelo de interação plasmídeo-BNNT, o melhor ajuste se deu para o modelo de sítio único. Este não significa que a molécula apresenta apenas um sítio de interação com o ligante e sim pode apresentar n sítios idênticos. A estequiometria do sistema, contudo, sugere que milhares de plasmídeos interagem com um nanotubo, hipótese pouco verossímil. Provavelmente o enorme tamanho do plasmídeo inviabiliza a quantificação de interação, além da grande complexidade do sistema.

Diferente das isotermas obtidas para os nucleotídeos separados, as duas análises com cadeias de nucleotídeos apresentaram picos exotérmicos. Novamente, o fato da interação BNNT-nucleotídeos ter sido endotérmico não implica em uma reação exotérmica quando se analisam sequências destas moléculas, uma vez que a ligação de pontes de fosfato entre as bases pode mudar completamente o comportamento de interação com o nanomaterial. Assim como visto com as bases, o formato da curva de titulação não apresenta o platô inicial; contudo esta atinge a saturação de modo a comprovar que há interação entre DNA e nanotubos de nitreto de boro.

#### 4.5 *Análise da interação de DNA com nanotubo de nitreto de boro por eletroforese de retardo*

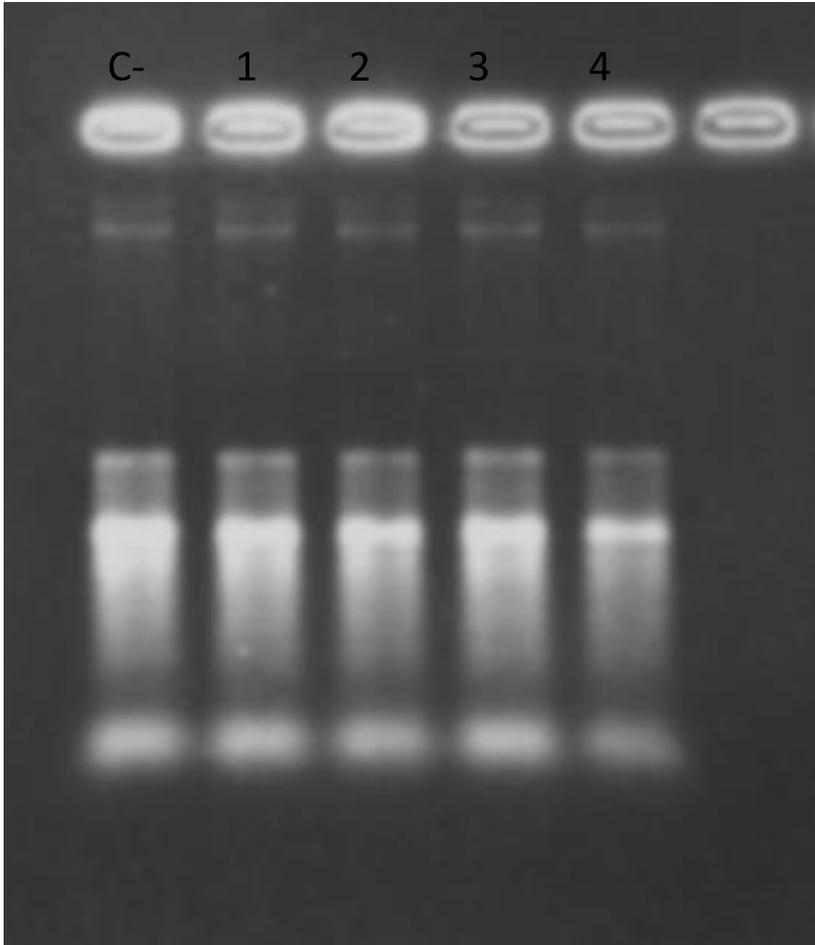


Figura 14 - Eletroforese da interação de pLUC com BNNT. C- correspondente ao controle negativo, sem a presença de BNNT. Proporções pLUC/BNNT de 1- 2/0,6 ; 2- 2/1,25 ; 3- 2/2,5 ; 4- 2/5

A fim de se verificar a interação DNA-BNNT, propôs-se também um ensaio de eletroforese de retardo, sendo que este pode ser visto na Figura 14. Como pode ser observado, o fragmento correspondente ao plasmídeo apresenta menor intensidade quando posto em contato com uma maior concentração de nanotubos de nitreto de boro, havendo um retardo em sua migração causada pela interação com o nanomaterial.

Percebe-se este retardo principalmente no fragmento com proporção de 2 para 5. Entretanto, por não ter retardado de forma total, pode-se inferir que a força de interação de material genético com BNNT é fraca.

A produção de um material híbrido de DNA com BNNT por aquecimento já havia sido descrito anteriormente, no qual o DNA de fita dupla se enrolava no entorno do nanotubo quando aquecido a 90°C (Zhi, Bando et al. 2007). Esta interação é também proposta na temperatura corpórea de 37°C, verificada por ITC justamente nesta temperatura. Deste modo, as propriedades termoestáveis e de condutância apresentadas pelos BNNT indicam grandes aplicações em seu uso não só no ramo de nanoeletrônica, mas também nas áreas de carreadores de drogas, genes e outros insumos terapêuticos. Sua utilização deve, entretanto ser bem controlada, uma vez que essa propriedade de interação com DNA pode ter consequências nocivas, como no caso de facilitar a transformação bacteriana, também já demonstrada neste trabalho.

## 5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- A construção de um vetor plasmidial para deleção do gene *luxS* utilizando o cassete de resistência a espectinomicina se deu de maneira efetiva, uma vez que os genes em questão foram devidamente amplificados com seus respectivos oligonucleotídeos.
- A transformação do vetor plasmidial foi realizada com sucesso, gerando uma cepa mutante resistente à espectinomicina Pn360 $\Delta$ *luxS*.
- As nanopartículas de sílica mesoporosa influenciam na taxa de transformação de *Streptococcus pneumoniae* em altas concentrações, provavelmente interagindo com a DNase bacteriana e impedindo que esta degrade o material genético exógeno.
- Os nanotubos de nitreto de boro aumentam a taxa de transformação por obter um p estatisticamente muito significativo de  $p < 0,001$
- Análises por ITC mostram que nanotubos de nitreto de boro interagem com material genético, sendo este nucleotídeos, oligonucleotídeos ou plasmídeos.

## 6. Perspectivas futuras

- Verificar a expressão do gene *luxS* na cepa mutante Pn360 $\Delta$ *luxS* por Real Time PCR.
- Analisar a influência de BNNT na taxa de transformação de outras espécies de bactérias, como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*.
- Realizar ensaios de ITC para verificar a interação de outros nanomateriais com DNA, como óxido de grafeno e nanopartículas de sílica mesoporosa.

## 7. Referências bibliográficas

- Ababou, A. and J. E. Ladbury (2006). "Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry." J Mol Recognit **19**(1): 79-89.
- Allegrucci, M., F. Z. Hu, K. Shen, J. Hayes, G. D. Ehrlich, J. C. Post and K. Sauer (2006). "Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development." J Bacteriol **188**(7): 2325-2335.
- Anindya Das, A. K. S., Prabal K. Maiti, Mili Das, R. Varadarajan, C.N.R. Rao (2008). "Binding of nucleobases with single-walled carbon nanotubes: Theory and experiment." Chemical Physics Letters **453**: 7.
- Attaiech, L., A. Olivier, I. Mortier-Barriere, A. L. Soulet, C. Granadel, B. Martin, P. Polard and J. P. Claverys (2011). "Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity." PLoS Genet **7**(6): e1002156.
- Blossom, D. B., G. Namayanja-Kaye, J. Nankya-Mutyoba, J. B. Mukasa, H. Bakka, S. Rwambuya, A. Windau, S. Bajaksouzian, C. J. Walker, M. L. Joloba, C. Kityo, P. Mugenyi, C. C. Whalen, M. R. Jacobs and R. A. Salata (2006). "Oropharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* among HIV-infected adults in Uganda: assessing prevalence and antimicrobial susceptibility." Int J Infect Dis **10**(6): 458-464.
- Burghout, P., H. J. Bootsma, T. G. Kloosterman, J. J. Bijlsma, C. E. de Jongh, O. P. Kuipers and P. W. Hermans (2007). "Search for genes essential for pneumococcal transformation: the RADA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA." J Bacteriol **189**(18): 6540-6550.
- Cassone, M., A. L. Gagne, L. A. Spruce, S. H. Seeholzer and M. E. Sebert (2012). "The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide." J Biol Chem **287**(46): 38449-38459.
- Chandler, M. S. and D. A. Morrison (1988). "Identification of two proteins encoded by com, a competence control locus of *Streptococcus pneumoniae*." J Bacteriol **170**(7): 3136-3141.
- Cilloniz, C., E. Polverino, S. Ewig, S. Aliberti, A. Gabarrus, R. Menendez, J. Mensa, F. Blasi and A. Torres (2013). "Impact of Age and Comorbidity on Etiology and Outcome in Community-Acquired Pneumonia." Chest.
- Ciofani, G., S. Danti, S. Nitti, B. Mazzolai, V. Mattoli and M. Giorgi (2013). "Biocompatibility of boron nitride nanotubes: an up-date of in vivo toxicological investigation." Int J Pharm **444**(1-2): 85-88.

- Ciofani, G., S. Del Turco, G. G. Genchi, D. D'Alessandro, G. Basta and V. Mattoli (2012). "Transferrin-conjugated boron nitride nanotubes: protein grafting, characterization, and interaction with human endothelial cells." Int J Pharm **436**(1-2): 444-453.
- Croucher, N. J., S. R. Harris, L. Barquist, J. Parkhill and S. D. Bentley (2012). "A high-resolution view of genome-wide pneumococcal transformation." PLoS Pathog **8**(6): e1002745.
- Domenech, M., E. Ramos-Sevillano, E. Garcia, M. Moscoso and J. Yuste (2013). "Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun.
- Dubnau, D. (1999). "DNA uptake in bacteria." Annu Rev Microbiol **53**: 217-244.
- Ehlert, N., P. P. Mueller, M. Stieve, T. Lenarz and P. Behrens (2013). "Mesoporous silica films as a novel biomaterial: applications in the middle ear." Chem Soc Rev **42**(9): 3847-3861.
- Ejsmont, R. K., P. Ahlfeld, A. Pozniakovsky, A. F. Stewart, P. Tomancak and M. Sarov (2011). "Recombination-mediated genetic engineering of large genomic DNA transgenes." Methods Mol Biol **772**: 445-458.
- Ferreira, T. H. (2011). "A Novel Synthesis Route to Produce Boron Nitride Nanotubes for Bioapplications." Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology **02**: 8.
- Gao, Z., C. Zhi, Y. Bando, D. Golberg and T. Serizawa (2010). "Isolation of individual boron nitride nanotubes via peptide wrapping." J Am Chem Soc **132**(14): 4976-4977.
- Hausdorff, W. P., G. Siber and P. R. Paradiso (2001). "Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children." Lancet **357**(9260): 950-952.
- Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy and D. A. Morrison (1995). "An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11140-11144.
- Hollanda, L. M., G. C. Cury, R. F. Pereira, G. A. Ferreira, A. Sousa, E. M. Sousa and M. Lancellotti (2011). "Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation." J Nanobiotechnology **9**: 28.
- Hui, F. M. and D. A. Morrison (1991). "Genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: nucleotide sequence analysis shows comA, a gene required for competence induction, to be a member of the bacterial ATP-dependent transport protein family." J Bacteriol **173**(1): 372-381.

Iannelli, F., M. R. Oggioni and G. Pozzi (2005). "Sensor domain of histidine kinase ComD confers competence pherotype specificity in *Streptococcus pneumoniae*." FEMS Microbiol Lett **252**(2): 321-326.

Imran, M. N., P. H. Leng, S. Yang, A. Kurup and P. Eng (2005). "Early predictors of mortality in pneumococcal bacteraemia." Ann Acad Med Singapore **34**(7): 426-431.

Ispahani, P., R. C. Slack, F. E. Donald, V. C. Weston and N. Rutter (2004). "Twenty year surveillance of invasive pneumococcal disease in Nottingham: serogroups responsible and implications for immunisation." Arch Dis Child **89**(8): 757-762.

Jelesarov, I. and H. R. Bosshard (1999). "Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition." J Mol Recognit **12**(1): 3-18.

Johnsborg, O. and L. S. Havarstein (2009). "Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*." FEMS Microbiol Rev **33**(3): 627-642.

Joloba, M. L., B. R. Kidenya, D. P. Kateete, F. A. Katabazi, J. K. Muwanguzi, B. B. Asiimwe, S. P. Alarakol, J. L. Nakavuma, S. Bajaksouzian, A. Windau and M. R. Jacobs (2010). "Comparison of transformation frequencies among selected *Streptococcus pneumoniae* serotypes." Int J Antimicrob Agents **36**(2): 124-128.

Joyce, E. A., A. Kawale, S. Censini, C. C. Kim, A. Covacci and S. Falkow (2004). "LuxS is required for persistent pneumococcal carriage and expression of virulence and biosynthesis genes." Infect Immun **72**(5): 2964-2975.

Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton and P. W. Andrew (2008). "The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nat Rev Microbiol **6**(4): 288-301.

Kaur, G., O. P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott and G. Pickrell (2013). "A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation." J Biomed Mater Res A.

Lahiri, D., V. Singh, A. P. Benaduce, S. Seal, L. Kos and A. Agarwal (2011). "Boron nitride nanotube reinforced hydroxyapatite composite: mechanical and tribological performance and in-vitro biocompatibility to osteoblasts." J Mech Behav Biomed Mater **4**(1): 44-56.

Lancellotti M, H. L., Sousa EBM, Ferreira TH (2013). Process for producing boron nitride nanotubes, boron nitride nanotube, use of the boron nitride nanotube, and method for transforming bacteria. **2,013,037,019**.

Lewis, M. W. F. a. E. A. (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. METHODS IN CELL BIOLOGY. **84**.

Lizcano, A., T. Chin, K. Sauer, E. I. Tuomanen and C. J. Orihuela (2010). "Early biofilm formation on microtiter plates is not correlated with the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae*." Microb Pathog **48**(3-4): 124-130.

Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1994). "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment." Microbiol Rev **58**(3): 563-602.

Luo, P., H. Li and D. A. Morrison (2003). "ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol **50**(2): 623-633.

Mangwani, N., H. R. Dash, A. Chauhan and S. Das (2012). "Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology." J Mol Microbiol Biotechnol **22**(4): 215-227.

Manshian, B. B., G. J. Jenkins, P. M. Williams, C. Wright, A. R. Barron, A. P. Brown, N. Hondow, P. R. Dunstan, R. Rickman, K. Brady and S. H. Doak (2013). "Single-walled carbon nanotubes: differential genotoxic potential associated with physico-chemical properties." Nanotoxicology **7**(2): 144-156.

Mattos, I. B., D. A. Alves, L. M. Hollanda, H. J. Ceragiogli, V. Baranauskas and M. Lancellotti (2011). "Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process." J Nanobiotechnology **9**: 53.

Mercenier, A. and B. M. Chassy (1988). "Strategies for the development of bacterial transformation systems." Biochimie **70**(4): 503-517.

Neagoe, I. B., C. Braicu, C. Matea, C. Bele, G. Florin, K. Gabriel, C. Veronica and A. Irimie (2012). "Efficient siRNA delivery system using carboxylated single-wall carbon nanotubes in cancer treatment." J Biomed Nanotechnol **8**(4): 567-574.

Nieto, P. A., S. A. Riquelme, C. A. Riedel, A. M. Kalergis and S. M. Bueno (2013). "Gene elements that regulate *Streptococcus pneumoniae* virulence and immunity evasion." Curr Gene Ther **13**(1): 51-64.

O'Brien, K. L., L. J. Wolfson, J. P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O. S. Levine, T. Cherian, Hib and T. Pneumococcal Global Burden of Disease Study (2009). "Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates." Lancet **374**(9693): 893-902.

Pestova, E. V., L. S. Havarstein and D. A. Morrison (1996). "Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system." Mol Microbiol **21**(4): 853-862.

- Pierce, M. M., C. S. Raman and B. T. Nall (1999). "Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions." Methods **19**(2): 213-221.
- Pozzi, G., L. Masala, F. Iannelli, R. Manganelli, L. S. Havarstein, L. Piccoli, D. Simon and D. A. Morrison (1996). "Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone." J Bacteriol **178**(20): 6087-6090.
- Prescott, L., Harley, J.P., and D. Klein (2002). Microbiology, McGraw-Hill.
- Ravindran, A., P. Chandran and S. S. Khan (2013). "Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects." Colloids Surf B Biointerfaces **105**: 342-352.
- Reading, N. C. and V. Sperandio (2006). "Quorum sensing: the many languages of bacteria." FEMS Microbiol Lett **254**(1): 1-11.
- Remond, M. G., A. P. Ralph, S. J. Brady, J. Martin, E. Tikoft and G. P. Maguire (2010). "Community-acquired pneumonia in the central desert and north-western tropics of Australia." Intern Med J **40**(1): 37-44.
- Ribeiro, H., Assunção, J.V. (2002). "Efeitos das queimadas na saúde humana." Estudos Avançados **16**(24).
- Rivera-Munoz, E. M. and R. Huirache-Acuna (2010). "Sol Gel-Derived SBA-16 Mesoporous Material." Int J Mol Sci **11**(9): 3069-3086.
- Rojas-Chapana, J., J. Troszczyńska, I. Firkowska, C. Morszeck and M. Giersig (2005). "Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells." Lab Chip **5**(5): 536-539.
- Romieu, I., N. Gouveia, L. A. Cifuentes, A. P. de Leon, W. Junger, J. Vera, V. Strappa, M. Hurtado-Diaz, V. Miranda-Soberanis, L. Rojas-Bracho, L. Carbajal-Arroyo, G. Tzintzun-Cervantes and H. E. I. H. R. Committee (2012). "Multicity study of air pollution and mortality in Latin America (the ESCALA study)." Res Rep Health Eff Inst(171): 5-86.
- Rubilar, O., M. Rai, G. Tortella, M. C. Diez, A. B. Seabra and N. Duran (2013). "Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications." Biotechnol Lett.
- Rylance, J., S. B. Gordon, L. P. Naeher, A. Patel, J. R. Balmes, O. Adetona, D. K. Rogalsky and W. J. Martin, 2nd (2013). "Household air pollution: a call for studies into biomarkers of exposure and predictors of respiratory disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **304**(9): L571-578.
- Sambrook J, F. E. a. M. T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shahbazi, M. A., B. Herranz and H. A. Santos (2012). "Nanostructured porous Si-based nanoparticles for targeted drug delivery." Biomatter **2**(4): 296-312.

Shen, S. C., W. K. Ng, L. S. Chia, Y. C. Dong and R. B. Tan (2013). "Applications of Mesoporous Materials as Excipients for Innovative Drug Delivery and Formulation." Curr Pharm Des.

Steinmoen, H., E. Knutsen and L. S. Havarstein (2002). "Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7681-7686.

Suwalski, A., H. Dabboue, A. Delalande, S. F. Bensamoun, F. Canon, P. Midoux, G. Saillant, D. Klatzmann, J. P. Salvetat and C. Pichon (2010). "Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles." Biomaterials **31**(19): 5237-5245.

Syvanen, M. (2012). "Evolutionary implications of horizontal gene transfer." Annu Rev Genet **46**: 341-358.

Trappetti, C., L. Gualdi, L. Di Meola, P. Jain, C. C. Korir, P. Edmonds, F. Iannelli, S. Ricci, G. Pozzi and M. R. Oggioni (2011). "The impact of the competence quorum sensing system on *Streptococcus pneumoniae* biofilms varies depending on the experimental model." BMC Microbiol **11**: 75.

Trappetti, C., A. Kadioglu, M. Carter, J. Hayre, F. Iannelli, G. Pozzi, P. W. Andrew and M. R. Oggioni (2009). "Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host." J Infect Dis **199**(10): 1497-1505.

Trappetti, C., A. J. Potter, A. W. Paton, M. R. Oggioni and J. C. Paton (2011). "LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun **79**(11): 4550-4558.

Varghese, N., U. Mogera, A. Govindaraj, A. Das, P. K. Maiti, A. K. Sood and C. N. Rao (2009). "Binding of DNA nucleobases and nucleosides with graphene." Chemphyschem **10**(1): 206-210.

Vernatter, J. and L. A. Pirofski (2013). "Current concepts in host-microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia." Curr Opin Infect Dis **26**(3): 277-283.

Ween, O., P. Gaustad and L. S. Havarstein (1999). "Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol **33**(4): 817-827.

Zhang, X., X. Zhang, S. Wang, M. Liu, Y. Zhang, L. Tao and Y. Wei (2013). "Facile incorporation of aggregation-induced emission materials into mesoporous silica nanoparticles for intracellular imaging and cancer therapy." ACS Appl Mater Interfaces **5**(6): 1943-1947.

Zhao, D., J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka and G. D. Stucky (1998). "Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores." Science **279**(5350): 548-552.

Zhi, C., Y. Bando, W. Wang, C. Tang, H. Kuwahara and D. Golberg (2007). "DNA-mediated assembly of boron nitride nanotubes." Chem Asian J **2**(12): 1581-1585.

Zhu, H., J. Zhao, X. Lin, Y. Hong, C. Li and Z. Yang (2013). "Design, synthesis and evaluation of dual-modality glyco-nanoparticles for tumor imaging." Molecules **18**(6): 6425-6438.

## 8. Anexos

### 8.1 Tabela de valores

	Kd1 ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{H1}$ (kcal/mole)	$\Delta\text{S1}$ (cal/mole/deg)	Kd2 ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{H2}$ (kcal/mole)	$\Delta\text{S2}$ (cal/mole/deg)	Kd3 ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\text{H3}$ (kcal/mole)	$\Delta\text{S3}$ (cal/mole/deg)
<b>ATP</b>	12.1	$3.5 \pm 0,257$	33.84	114	$-22.5 \pm 20$	-54.74	15.3	$22.9 \pm 20.1$	97.78
<b>CTP</b>	128	$4.9 \pm 1$	33.82	145	$1.1 \pm 2.5$	21.14	129	$-11.5 \pm 4$	-19.53
<b>GTP</b>	7.72	$2.5 \pm 0.2$	31.70	30.7	$-7.7 \pm 4.6$	-4.3	13.2	$8.4 \pm 3.3$	49.52
<b>TTP</b>	59.63	$2.7 \pm 0.7$	28.05	181	$-4.5 \pm 3.7$	2.38	26.06	$2.1 \pm 4.9$	27.71
<b>Primer</b>	11.04	$-35 \pm 0.5$	-90.34	14.24	$712 \pm 665$	2321	9.58	$-3.6\text{E}3 \pm 9.3\text{E}3$	-1.16E4
<b>Plasmid</b>	1.668E8	-1.858E8	-5953						

