

Gisele Cristiane Gentile Cury

**“Estudo Molecular *in vitro* da Transferência Horizontal de genes
entre as bactérias *Haemophilus influenzae* e *Neisseria
meningitidis*”**

**Campinas – SP
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GISELE CRISTIANE GENTILE CURY

**“Estudo Molecular *in vitro* da Transferência Horizontal de genes entre
as bactérias *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da TESE defendida pela candidata

Gisele Cristiane Gentile Cury



e aprovada pela Comissão Examinadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do Título de
Doutora em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

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
Cury, Gisele Cristiane Gentile, 1980-
C949e Estudo molecular *in vitro* da transferência horizontal de genes entre as bactérias
Haemophilus influenzae e *Neisseria meningitidis* /Gisele Cristiane Gentile Cury. –
Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Lancellotti.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Transferência genética horizontal. 2. *Neisseria meningitidis*. 3.
Haemophilus influenzae. I. Lancellotti, Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de
Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Molecular studies *in vitro* horizontal gene transfer
between bacteria

Haemophilus influenzae and *Neisseria meningitidis*

Palavras-chave em inglês:

Gene transfer, horizontal

Neisseria meningitidis

Haemophilus influenzae

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Lancellotti [Orientador]

Cleyton Crepaldi Domingues

Márcia Aparecida Sperança

Wilton Rogério Lustri

Marcus Alexandre Finzi Corat

Data de defesa: 19-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Powered by TCPDF (www.tcpdf.org)

Campinas, 19 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (orientador)


Assinatura

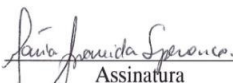
Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

Assinatura

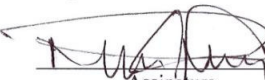
Dr. Cleyton Crepaldi Domingues


Assinatura

Profa. Dra. Márcia Aparecida Sperança


Assinatura

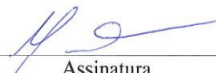
Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri


Assinatura

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida

Assinatura

Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat


Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão

Assinatura

RESUMO

Neisseria meningitidis, ou meningococo, é uma bactéria comensal da nasofaringe humana. Algumas linhagens meningocócicas ultrapassam a mucosa respiratória e a barreira hematoencefálica e causam enfermidades como meningite e septicemia (meningococcemia ou *purpura fulminans*). A bactéria *Haemophilus influenzae*, importante patógeno humano pode ser encontrada em diferentes patologias como: otites médias, sinusites, amigdalites, faringites, pneumonias entre outras. A espécie humana é o único hospedeiro natural para esse patógeno. Este trabalho teve por finalidade o estudo molecular das espécies bacterianas *H. influenzae* e *N. meningitidis*, com objetivo central de analisar a transferência horizontal do gene *lav* relacionado ao mecanismo de autotransporte lipídico existente no meningococo e sua transferência para linhagens de *H. influenzae* não causadores do quadro de *purpura fulminans* ou meningococcemia. Foi dado um enfoque maior as linhagens de *H. influenzae* biótipo *aegyptius* e causadoras da febre púrpura brasileira (*brazilian purpuric fever* - BFP) por se tratar de uma patologia em que os mecanismos de virulência pouco conhecidos e por possuírem mecanismos de virulência como produtos de transferência horizontal provenientes do meningococo. Foram desenvolvidos modelos de infecção celular visando o estudo da(s) patologia (s) destes microorganismos para avaliar a adesão e a expressão de quimiocinas inflamatórias em culturas *in vitro* de células humanas. Tal modelo realizado pela infecção de células endoteliais humanas, linhagem Hec-1B, por mutantes de linhagens de *H. influenzae* não causadores da febre púrpura brasileira contendo o gene *lav* proveniente da linhagem virulenta meningocócica B4.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis, or meningococcus, is a commensal bacterium of the human nasopharynx. However, some strains of meningococcus occasionally exceed the respiratory mucosa and the blood brain barrier and cause diseases such as meningitis and septicemia (meningococcemia or *purpura fulminans*). The bacterium *Haemophilus influenzae* is also an important human pathogen and can be found in different diseases such as otitis media, sinusitis, tonsillitis, pharyngitis, pneumonia, in addition to meningitis and other infections in children. As the human species is the only natural host for this pathogen, *in vitro* studies with cell models are an important tool for the analysis of the interaction between these pathogens and their host. This work aimed to molecular study of *H. influenzae* and *N. meningitidis*, with horizontal gene transfer analysis of *lav* gene related to the mechanism of lipid autotransporter existing in meningococcus and its transfer to strains of *H. influenzae* causing the frame *purpura fulminans* or meningococcemia. Therefore, a greater focus has been given the strains of *H. influenzae* biotype *egyptius* causing fever and purple Brazilian (Brazilian Purpuric Fever - BFP) because it is a condition in which the virulence mechanisms are poorly understood and these strains possess virulence mechanisms as products of horizontal transfer from the meningococcus. Also, infection models were developed for the study of cell (s) condition (s) of these microorganisms to evaluate the morphology and expression of inflammatory chemokines *in vitro* cultures of human cells. This model done by infection of human endothelial cells, the immortalized cell line Hec-1b, by mutant obtained of transferred *lav* gene from meningococcus B4 strains for a *H. influenzae* strains non- causing fever purple.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de ilustrações	xv
Lista de tabelas	xvii
Lista de abreviaturas e siglas	xix
1. INTRODUÇÃO	
1.1 <i>Haemophilus influenzae</i>	02
1.2 <i>Neisseria meningitidis</i>	03
1.3 <i>Haemophilus influenzae</i> biotipo <i>aegyptius</i>	06
1.4 Transferência horizontal de genes entre linhagens de <i>N. meningitidis</i> e <i>H. influenzae</i>	09
1.4 Modelos de estudos	12
2. JUSTIFICATIVAS	14
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivos Gerais	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Meios de Cultura	19
4.1.1 Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar	19
4.1.2 Ágar Chocolate	19
4.1.3 Meio GC	19
4.1.4 Meio Luria Bertani (LA e LB)	19
4.2 Métodos	
4.2.1 Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento	22
4.2.2 Extração de DNA Genômico	22
4.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	23
4.2.4 Extração de DNA Plasmidial em média escala	
4.2.5 Transformação em células competentes de <i>Escherichia coli</i>	
4.2.5.1 Preparo de Células Competentes de DH5- α	25
4.2.6 CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA MUTAÇÃO	
4.2.6.1 Processo de Transformação do vetor pLAN78 em <i>Escherischia coli</i> linhagem DH5 α	26
4.2.6.2 Clonagem do gene <i>lasi</i> em pGem®-T Easy (Promega) do fragmento amplificado por PCR	27

4.2.6.3 Clonagem do gene <i>lasf</i> em pGem®-T Easy (Promega) do fragmento amplificado por PCR	28
4.2.6.4 Inserção do gene de resistência a Eritromicina à fusão do gene <i>lasi</i> em pGEM-T easy	28
4.2.6.5 Fusão do fragmento amplificado da mutação pLAN77 no pLAN76	30
4.2.7 Processo de Transformação do vetor pLAN78 em <i>Neisseria meningitidis</i> linhagem B4	31
4.2.8 Processo de transformação do DNA mutante da LG2 em linhagens de <i>H. influenzae</i> Rd e Blac	32
4.2.9 Cultivo de células Hec-1b (carcinoma endometriose humana COM ANCORAGEM)	34
4.2.10 Teste de Infecção em células Hec-1b	
4.2.10.1 Ensaio de adesão	35
4.2.10.2 Caracterização do percentual de adesão em monoculturas Celulares	36
4.2.11 Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias	
4.2.11.1 Extração de RNA	37
4.2.11.2 Dosagem de Quimiocinas inflamatórias por PCR em tempo real quantitativo (qRT – PCR).	38
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 40
5.1 Seleção e verificação dos clones (mutantes)	42
5.2 Análise da expressão das quimiocinas realizadas em Hec-1B	44
5.3 Análise da adesão em células Hec-1B	49
 6. CONCLUSÕES	 54
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. APÊNDICES	
9.1 Artigos autoria/coautoria	70

DEDICATÓRIA

A Deus, pai de infinita bondade e força que
sempre me ampara e conduz.

A minha querida mãe, Margarida
“Minha eterna inspiração”
(*in memoriam*)

Ao meu pai Rui, pelo carinho e apoio
durante esta jornada.

Aos meus filhos, Luana e Artur, a grande razão
de todo meu esforço.

Ao meu marido Jofre, pelo amor, paciência e
confiança.

A minha tia Rosalina Gentile Beltrame
pelo primeiro tijolinho.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Marcelo Lancellotti. Professor e amigo. Agradeço pela orientação, entusiasmo, paciência e compreensão em todos os momentos. Obrigada por me ajudar a descobrir o curioso mundo da pesquisa e por me fazer perceber que a pesquisa pode ser, além de tudo, divertida e intrigante.

A pós-doutoranda Luciana Maria Hollanda pela amizade, pelo apoio e valiosas sugestões.

A todos os amigos do LABIOTEC, pelo carinho, amizade e pela convivência durante esse período.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

As minhas tias, Natalice, Veronice, Cacilda e Conceição pelo apoio, carinho e paciência.

A FAPESP, pelo apoio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

A UNICAMP, por permitir novamente que eu conquiste outro objetivo em seus domínios.

Obrigada!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Construção e fusão do gene <i>lasi</i> amplificado no plasmídeo pGem®-T Easy (Promega) contendo o sítio de restrição <i>Bam</i> HI, denominado pLAN75 .	27
Figura 2. Construção e fusão do gene <i>lasf</i> amplificado no plasmídeo pGem®-T Easy (Promega) contendo o sítio de restrição <i>Bam</i> HI, denominado pLAN76 .	28
Figura 3. Inserção do cassete <i>ermAM</i> a fusão do gene <i>lasi</i> em pGEMT Easy (Promega) no sítio de restrição <i>Bam</i> HI, denominado pLAN77.	29
Figura 4. Gene <i>lasi</i> fusionado ao cassete <i>ermAM</i> foi inserido no sítio <i>Bam</i> HI de pLAN76 contendo o <i>lasf</i> , gerando uma fusão transcricional, formando o vetor pLAN78 .	30
Figura 5. O DNA plasmidial clonado foi transformado na amostra de <i>N. meningitidis</i> linhagem B4, originando a amostra LG2 .	32
Figura 6. Esquema representativo da metodologia em comum para a obtenção do percentual de adesão de <i>N. meningitidis</i> , <i>Hi</i> e <i>Hae</i> e determinação do perfil de expressão de quimionas inflamatórias em células (Hec-1B) submetidas à infecção.	36
Figura 7. Processo de construção e fusão dos genes <i>lasi</i> e <i>lasf</i> em pGEMT easy e inserção do cassete de resistência à eritromicina <i>ermAM</i> , originando o plasmídeo pLAN78 .	41
Figura 8 – Modelo esquemático e <i>purpura fulminans</i> causado por <i>N. meningitidis</i> .	45
Figura 9. Avaliação da expressão de quimiocinas em células Hec-1b: Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ da quantificação da expressão das quimiocinas IL-10 e TNF- α nesta linhagem celular submetida à infecção por <i>N. meningitidis</i> B epidêmica, B4, <i>H. influenzae</i> Rd, Hi 46, Blac, <i>H. influenzae</i> biótipo <i>aegyptius</i> Hae 254, Hae 284 e as mutantes LG2, Rd LG2 e Blac LG2. *** Teste de Tukey mostrando valor de $P=0,0098$ quando comparado com valor de IL10 produzido pela cepa β lac selvagem, sendo considerado muito significativo ($P \leq 0,05$).	47
Figura 10 – Modelo de recombinação para a origem das linhagens de <i>Haemophilus influenzae</i> biótipo <i>aegyptius</i> causadores de febre púrpura brasileira – Hae – BFP.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens utilizadas neste trabalho.	21
Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	23
Tabela 3 – Adesão das linhagens de <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Hae</i> – BPF em células Hec-1B período de 5 horas de infecção.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenina trifosfato

A549: célula imortalizada de carcinoma epitelial humano

BHE: Barreira Hematoencefálica

BHI: Brain Heart Infusion

CEACAM: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule

CD46: receptor celular humano encontrado em grandes quantidades em células nervosas da barreira hematoencefálica

Ct: threshold cycle

DNA: ácido desoxirribonucléico

DEPC: dietilpirocarbonato

DMSO: dimetil sulfoxido

ET: electroforetic type

GAPDH: D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GC: meio de cultura bacteriano sólido seletivo para *Neisseria*

GFAP: protein glial fibrilar ácida

Hae: *Haemophilus influenzae* biotipo *aegyptius*

Hi: *Haemophilus influenzae*

Hec-1B: célula imortalizada de adenocarcinoma de endométrio humano x

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IL-10: interleucina 10

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

KH₂PO₄: dihidrogenofosfato de potássio

K₂HPO₄: hidrogenofosfato de potássio

LOS: lipooligossacarideo

MLST: multilocus sequence typing

NSCLC: non-small cell lung cancer

Opa: proteína de Opacidade

PBP2: penicillin-binding protein 2

qRT-PCR: quantitative Real Time PCR

SFB: Soto Fetal Bovino

ST: sequence type

SNC: Sistema Nervoso Central

TE: Tris-EDTA

TNF- α : fator alfa de necrose celular

TRL: Toll like receptor

UFC: Unidade formadora de colônia

1.INTRODUÇÃO

1.1 *Haemophilus influenzae*

Sabe-se que o trato respiratório humano é colonizado por diversos microrganismos. Contudo alguns desses microrganismos são responsáveis por infecções que se iniciam nas vias respiratórias e chegam a cruzar as defesas do sistema imunológico, provocando enfermidades como pneumonias, amigdalites, sinusites, septicemias e meningites, além de outras mais raras, como meningoencefalites e choques sépticos (Kroll *et al.*, 1995, Kroll *et al.*, 1998). Dentre tais bactérias estão, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (ou meningococo), as quais possuem a capacidade de serem naturalmente competentes ao processo de transformação bacteriana (Kroll *et al.*, 1998).

A bactéria *Haemophilus influenzae* é um importante patógeno humano podendo ser encontrada em diferentes patologias como: otites médias, sinusites, amigdalites, faringites, pneumonias; além de meningites e outras infecções em crianças (Kroll *et al.*, 1988).

A respeito de sua classificação, tal espécie pode ser subdividida por dois métodos, em biotipos e em sorotipos. A divisão em biotipos baseia-se na presença e produção de enzimas como ornitina descarboxilase, urease, 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, 1962). Similarmente ao meningococo, as cápsulas são consideradas como o antígeno principal deste microorganismo sendo compostas por um polímero de 3- α -D-ribose-(1-1)-ribitol fosfato (PRP) cuja estrutura antigênica divide as linhagens capsuladas em 6 sorotipos a - f (Kroll *et al.*, 1991). O segmento genético responsável pela síntese deste poliosídeo é composto de uma duplicação sequencial de um segmento de cerca de 18Kb (Hoiseth *et al.*, 1985, Hoiseth *et al.*, 1986)– a região *capB*.

Fatores antigênicos igualmente relevantes em *H. influenzae* podem ser citados tal como: a proteína receptora de transferrina humana – a Tbp (Webb (Webb & Cripps, 1999a). Tal proteína, tem considerável atenção quanto ao seu potencial vacinal, principalmente por estar presente em *H. influenzae* de todos os sorotipos - incluindo cepas NTHi – “*Nontypeable Haemophilus influenzae*” (Webb & Cripps, 1999b) e também ser expressa em *N. meningitidis* (Holland *et al.*, 1996). A proteína Tbp pode ser encontrada em duas formas, a Tbp1 e a Tbp2. A primeira delas, com cerca de 105 kDa, é detectada em linhagens de *H. influenzae* tanto do tipo b quanto nos NTHi. Entretanto, a Tbp2 além de ser encontrada também em *H. influenzae* com peso molecular variando entre 79 a 94 kDa, também pode ser detectada em *N. meningitidis* (Webb & Cripps, 1999a).

1.2. *Neisseria meningitidis*

A bactéria *Neisseria meningitidis* é considerada um membro comensal da nasofaringe humana, mas que pode causar enfermidades invasivas como uma síndrome séptica ou infecção generalizada (meningococcemia) e pode causar inflamação nas membranas que revestem o sistema nervoso central (meninge).

A *doença meningocócica* é uma infecção bacteriana aguda, rapidamente fatal. Estima-se a ocorrência de pelo menos 500 mil casos de *doença meningocócica* por ano no mundo, com cerca de 50 mil óbitos. É uma doença de evolução rápida e com alta letalidade, que varia de 7 até 70%. Mesmo em países com assistência médica adequada, a meningococcemia pode ter uma letalidade de até 40%. Geralmente acomete crianças e adultos jovens, mas em situações epidêmicas, a doença pode atingir pessoas de todas as faixas etárias (Childers & Cobanov, 2003, de Souza *et al.*, 2007, Famularo *et al.*, 2000, Levy-Bruhl *et al.*, 2002, , 1987, Zwahlen & Waldvogel, 1984).

O ser humano é o único hospedeiro natural da *N. meningitidis*. Cerca de 10% dos adolescentes e adultos são portadores assintomáticos da bactéria na orofaringe e podem transmitir a bactéria, mesmo sem adoecer. A bactéria é transmitida de uma pessoa para outra pela secreção respiratória (gotículas de saliva, espirro, tosse). Geralmente, após a transmissão, a bactéria permanece na orofaringe do indivíduo receptor por curto período e acaba sendo eliminada pelos próprios mecanismos de defesa do organismo. Desta forma, a condição de portador assintomático tende a ser transitória, embora possa se estender por períodos prolongados de meses a até mais de um ano.

Em menos de 1% dos indivíduos infectados a bactéria consegue penetrar na mucosa respiratória e atingir a corrente sanguínea levando o aparecimento da *doença meningocócica*. A invasão geralmente ocorre nos primeiros cinco dias após o contágio. Os fatores que determinam o aparecimento de doença invasiva ainda não são totalmente esclarecidos.

A doença meningocócica ou *purpura fulminans* tem distribuição global, podendo ocorrer surtos ocasionais e epidemias em qualquer país do mundo. A África é a região com maior número de casos no mundo, principalmente na região semi-árida sub-Saariana, conhecida como “cinturão da meningite” que se estende do Senegal até a Etiópia, afetando cerca de 15 países (Caugant *et al.*, 1986, Deghmane *et al.*, 2009, Lancellotti *et al.*, 2006, Zarantonelli *et al.*, 2008, , 2003). Nesta região, a *doença meningocócica* representa uma ameaça há, pelo menos, 100 anos com epidemias recorrentes a cada 8 a 12 anos, freqüentemente resultando em uma taxa de ataque 500 a 1000 vezes maior do que a de uma população em país desenvolvido.

Sabe-se que as alterações climáticas influenciam a dinâmica da transmissão da doença meningocócica e as epidemias são mais frequentes durante o inverno nas regiões temperadas e nas estações secas em regiões tropicais.

A doença meningocócica pode ocorrer em pessoas de qualquer faixa etária, porém é mais comum em crianças até cinco anos e mais rara em idosos. Em geral, a incidência da doença é maior em países em desenvolvimento, especialmente em áreas com grandes aglomerados populacionais. A história de infecção recente pelo vírus influenza ([gripe](#)) e o tabagismo aumentam a chance de infecção meningocócica. Além disso, algumas pessoas por condições de doenças de base têm um maior risco de desenvolver a doença, como as submetidas à retirada cirúrgica do baço (esplenectomizados), ou as portadoras de disfunção do baço (asplenia funcional da anemia falciforme, da talassemia), ou aquelas com deficiências de imunoglobulinas e do complemento.

O maior fator de virulência desta bactéria é o polissacarídeo capsular, importante por conferir aos meningococos propriedades antifagocitárias e antibacterianas, e por isso facilitam a sobrevivência das bactérias durante a invasão na corrente sanguínea e do líquido cefalorraquidiano. que classifica a espécie em 13 diferentes sorogrupos: A, B, C, 29E, H, K, I, L, X, Y, W135 e Z., entretanto os envolvidos em casos epidêmicos são os sorogrupos A, B, C, Y and W135 (Relatório da Organização Mundial de Saúde *World Health Organization*, 1998). Os sorogrupos de *N. meningitidis* são baseados em diferenças antigênicas de seus polissacarídeos capsulares e, geralmente, caracterizados pela reação de aglutinação em lâmina com diferentes anti-soros policlonais específicos para cada sorogrupo. Tal polissacarídeo capsular é sintetizado pelo operon *syn* sendo composto por derivados do ácido siálico ou ácido N-acetil-neuramínico (Dolan-Livengood *et al.*, 2003) que pode se apresentar como homopolímeros (no caso dos sorogrupos B e C, compostos

pelo ácido α 2,8 e α 2,9-N-acetil neuramínico, respectivamente) ou heteropolímeros (como no caso dos sorogrupos Y e W135, compostos por 6D-glicose e 6D-galactose ligados ao ácido α -1,4-N neuramínico, respectivamente).

Já o sorogrupo A, freqüentemente isolado em países do cinturão africano da meningite (Swartley *et al.*, 1997) tem seu polissacarídeo capsular composto por α 1,6-N-acetil-manosamina-1-fosfato e o operon *syn* possui seu homólogo conhecido como operon *myn*, o qual é composto pelos genes *mynA-C*, implicados na síntese capsular dos meningococos pertencentes a este sorogrupo. O antígeno capsular no meningococo tem sido alvo de muitas pesquisas referentes à transferência de material genético além de ser uma das estruturas implicadas nos mecanismos de variação de fase, decorrente da presença de elementos de inserção no gene *synA* (IS1301; Hammerschmidt *et al.*, 1996) ou de repetições poliC no gene *synD* do sorogrupo B, responsável pela produção da enzima α -2,8-sialiltransferase implicada na síntese capsular.

1.3. *Haemophilus influenzae* biotipo *aegyptius*

A bactéria *H. influenzae* comumente estava relacionada a doenças não invasivas até a década de 80, quando *H. influenzae* biotipo *aegyptius* (*Hae*), bactéria frequentemente associada a casos de conjuntivite, foi caracterizado como causador de sepsis por ser o agente etiológico da Febre Purpúrica Brasileira (BPF – *Brazilian Purpuric Fever*). A BPF é uma doença sistêmica geralmente fatal que acomete crianças de 2 meses a 10 anos de idade, relatada pela primeira vez no Brasil em 1984, próxima a Ribeirão Preto, São Paulo. Tal doença é caracterizada por febre alta, vômitos, dor abdominal, evolução de um quadro hemorrágico e colapso vascular seguido de morte. Tais sintomas se manifestaram entre 7-10 dias após um episódio de conjuntivite purulenta (Brenner *et al.*, 1988).

Os grandes surtos de BPF ocorreram de 1984 a 1990 no Brasil e a ocorrência mais recente de BPF foi relatada em 2007 na região do Estado do Amazonas-Brasil (Santana-Porto *et al.*, 2009). Casos da doença também foram relatados em outros países como Austrália (McIntyre *et al.*, 1987) e Estados Unidos (Virata *et al.*, 1998). Porém, como o quadro clínico é muito similar a meningococcemia causada por *Neisseria meningitidis*, é possível que casos de BPF fossem e sejam ainda omitidos.

Em um estudo realizado por Brenner e colaboradores (1988), 15 cepas de *Hae* isoladas de casos de BPF e de cepas controle de *H. influenzae* e *Hae* não causador de BPF foram analisadas e diferenciadas por ferramentas fenotípicas, bioquímicas e genéticas. Os dados obtidos indicam que um único clone – o clone BPF- deu origem a todas as linhagens causadoras do surto de 1984 a 1990 que ocorreu em seis cidades brasileiras relativamente próximas (Brenner *et al.*, 1988).

O grupo de Brenner também identificou em linhagens causadoras de BPF a presença de um plasmídeo de 24-MDa com um padrão de restrição com a enzima *AccI* referido como 3031 (devido ao fato desse padrão ser primeiro observado na linhagem de *Hae* F3031 ou 254/86) (Brenner *et al.*, 1988). Através de sequenciamento, observou-se que esse plasmídeo apresenta dois domínios distintos; um domínio com genes semelhantes aos encontrados a plasmídeos conjugativos e outro com genes com funções desconhecidas e que apresenta nove cópias da sequência *uptake* específica de *Haemophilus*. Observou-se que o plasmídeo em questão não é similar o suficiente a qualquer outro plasmídeo conjugativo caracterizado para ser enquadrado em algum grupo de incompatibilidade e não foram identificados genes diretamente relacionados à virulência (Kroll *et al.*, 2002). Ainda, foram identificadas raras linhagens de *Hae* causadoras de BPF que não apresentam essa estrutura (Tondella *et al.*, 1995). Tais fatos indicam que essa estrutura não apresenta um envolvimento crítico na

virulência de *Hae*, apesar de não se conhecer totalmente os mecanismos de virulência desta bactéria. Porém, ao considerar a virulência única das linhagens *Hae* e a presença de um plasmídeo singular na maioria destas linhagens, tornam-se importantes estudos mais aprofundados sobre essa estrutura.

Por se tratar de uma doença invasiva, acreditava-se que uma cápsula polissacarídica fosse um dos fatores de virulência das linhagens *Hae* causadores de BPF; entretanto tais bactérias não apresentam genes capsulares presentes em outras linhagens de *H. influenzae* e até o momento não há evidência concreta que *Hae* causador de BPF seja um organismo capsulado (Carlone *et al.*, 1989). Se de fato, tal bactéria não for capsulada, isso a torna única entre os patógenos bacterianos invasivos, já que essa estrutura é essencial para o desenvolvimento de doenças invasivas (Harrison *et al.*, 2008).

Estudos *in vivo* com ratos com deficiência de complemento mostraram que linhagens de *Hae* isoladas depois da passagem no animal se tornam mais virulentas, apresentam mudanças no fenótipo do lipooligossacarídeo capsular (LOS), perda de pilina (estrutura protéica ligada à adesão bacteriana e no processo de reprodução) e alteração de outros fatores. Todavia, não se sabe ao certo quais alterações representam de forma mais fidedigna o fenótipo da bactéria quando infectam, por exemplo, o sangue de uma criança.

Sabe-se que a pilina de *Hae* é funcional e estruturalmente semelhante à de *H. influenzae* tipo b. Em ensaios *in vitro* foram recuperadas principalmente *Hae* desprovidas dessa estrutura e mais virulentas do que as piliadas. Curiosamente, as amostras isoladas diretamente de pacientes com BPF eram todas piliadas. Porém, dados do estudo sugerem que esta estrutura não seja um dos principais fatores vinculados à virulência de *Hae* causadores de BPF. De forma análoga a *H. influenzae* tipo b, epítomos do LOS

(lipooligossacarídeo) sofrem variação de fase em *Hae* e acredita-se que o LOS também possa ser um importante fator na patogenia de BPF (Rubin & St Geme, 1993).

1.4. Transferência horizontal de genes entre linhagens de *N. meningitidis* e *H. influenzae*

A transferência horizontal de genes relacionados à virulência apresenta um importante papel na evolução e surgimento de patógenos bacterianos. Assim, uma provável explicação sobre a origem do clone BPF-*Hae* é a aquisição de um ou mais genes de virulência pelo fenômeno em questão.

Em se tratando de variação e transferência gênica, sabe-se que o processo relacionado com a variação capsular, onde há uma transferência de material genético entre dois clones é conhecido como *switch* capsular. Tal processo, identificado pela primeira vez por Swartley *et al.* (Swartley *et al.*, 1997), promove a alteração de um sorogrupo a outro através da transmissão horizontal de material genético transformando, por exemplo, linhagens do tipo C em linhagens do tipo B, ou linhagens do tipo C em linhagens do tipo W135 (Taha *et al.*, 2001).

Através de estudos moleculares, identificaram-se dois tipos de plasmídeos portadores de resistência aos antimicrobianos em *H. influenzae*: pequenos e menores que 10kb, codificadores de TEM β -lactamase (que conferem resistência à ampicilina) e grandes geralmente maiores que 30MDa e codificando multiresistência (Leaves *et al.*, 2000). Plasmídeos TEM, também tem sido identificado em linhagens de *N. meningitidis* no Canadá (Dillon *et al.*, 1983), África do Sul (Botha, 1988) e Espanha (Vazquez *et al.*, 1996). Tal fenômeno sugere uma transferência de estruturas extra cromossômicas de um gênero bacteriano a outro. Entretanto, tanto em *H. influenzae* quanto em *N.meningitidis*, as

modificações do peptidoglicano têm sido associadas à diminuição da sensibilidade à penicilina G (Antignac *et al.*, 2001a). Tal fenômeno tem sido descrito como importante estratégia de aumento da resistência a penicilina, pela recombinação horizontal desta característica através da transformação entre linhagens dos genes de síntese e transporte das proteínas PBP (*penicilin, binding protein*) (Antignac *et al.*, 2001b).

Outros processos de transferências horizontais têm sido identificados entre dois desses microorganismos (*Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*). Kroll *et al.* (Kroll *et al.*, 1998), relatou a transferência de genes de *H. influenzae* para *N. meningitidis*, sugerindo a emergência de novas linhagens invasivas como resultado dessa troca genética. Além disso, o mesmo autor descreve a transferência do gene *sodC*, comumente detectado em *H. influenzae* tipo b, para *Neisseria meningitis*. Tal gene codifica para [Cu, Zn] – superóxido dismutase, que confere resistência ao fagossomo macrofágico e consequentemente um mecanismo de escape do sistema imunológico do hospedeiro análogo entre estas bactérias.

Kroll *et al* descreveram ainda que a linhagem de *H. influenzae* biotipo *aegyptius*, é resultado de um fenômeno de transferência gênica de *N. meningitidis* ao *H. influenzae* (Kroll *et al.*, 1998). Isso pode ser evidenciado pelo interessante fato de cepas de *H. influenzae* pertencentes ao biotipo *aegyptius* estarem frequentemente associados a casos de conjuntivites e nunca, até o surto citado, havia sido apontado como o agente causador de quadros de sepsis.

O choque séptico, comum em infecções causadas por *N. meningitidis* (meningococcemia) indicou uma provável transferência de algum(s) fator(s) de virulência(s) do meningococo para o *H. influenzae* biotipo *aegyptius* (Kroll *et al.*, 1998).

H. influenzae e *Neisseria meningitidis* são duas bactérias naturalmente competentes ao processo de transformação e que apresentam o mesmo nicho. Ambas possuem um sistema

de reconhecimento de DNA exógeno similar baseado em seqüências *uptake* (US) (Hood *et al.*, 1996, Peak *et al.*, 1999). Apesar de serem filogeneticamente distantes, sabe-se que há transferência gênica lateral entre as duas espécies.

Uma evidência da troca gênica entre *N. meningitidis* e *H. influenzae* baseia-se presença gene denominado *lav*. Acredita-se que tal gene pertença a uma família de autotransportadores AIDA-1/VirG/PerT associados à virulência, o qual se acredita ter sido transferido de *Neisseria* para *Haemophilus*. Através de análises de homologia e entre seqüências deste gene, observou-se que um novo tipo de transportador está presente em *Hae*, o qual foi descrito como *las*. Sugere-se que *las* seja um gene quimérico, oriundo da fusão de dois segmentos distintos e de origem exógena ao gênero *Haemophilus*. (Davis *et al.*, 2001).

Foram identificadas, também, seqüências conservadas na cepa MC58 de *N. meningitidis* em linhagens de *Hae* associadas aos surtos de febre purpúrica brasileira. As seqüências, denominadas NMB0419 em *N. meningitidis*, foram determinadas como *bfp001* em *Hae* (Li *et al.*, 2003).

Apesar de recentes avanços no reconhecimento sobre a constituição genômica de *Hae* e a predição de genes relacionados à sua virulência com o sequenciamento do genoma da linhagem F3031 (*Hae* 254/86) causadora de BPF (Strouts *et al.*), pouco se sabe ainda sobre o papel de possíveis genes de virulência *in vitro* e *in vivo*.

A patologia de BPF parece apresentar múltiplos estágios e depender de diversos fatores ainda desconhecidos. Por se tratar de uma doença invasiva com alta taxa de mortalidade, medidas profiláticas são de extrema valia. Estas podem ser obtidas através de um melhor conhecimento sobre o genoma de diferentes linhagens deste microrganismo (causadoras e

não causadoras de BPF) e sua comparação e da determinação do perfil metabólico em diferentes condições de infecção *in vitro*.

O surgimento de linhagens de *Hae* causadoras de febre purpúrica aparenta ser um dos principais indícios de transferência gênica entre *H. influenzae* e outro patógeno. Assim, é importante a caracterização do papel de possíveis genes envolvidos na virulência de *Hae*, como é o caso de *las* e o *NMB0419*.

O presente projeto tem como objetivo principal o avanço no conhecimento sobre a virulência desses patógenos. Será dado enfoque maior para o gene *lav*, associados à virulência, o qual se acredita ter sido transferido de *Neisseria* para *Haemophilus* segundo Davis e colaboradores. Num outro momento, estudos serão realizados baseando-se no gene *NM0419*, o qual pode estar também associado ao *Hae*.

1.5. Modelos de estudos

Para tentar elucidar tal processo em cada uma dessas bactérias, estudos estão sendo realizados para determinar modelos *in vivo*, visando desvendar os fatores de influência das condições fisiológicas do hospedeiro na transferência lateral de genes (Tauber *et al.*, 1994). Tais modelos têm tentado mimetizar, através de manutenção dos níveis séricos de transferrina humana, através da injeção de transferrina sintética nos animais (Salit & Tomalty, 1986) (Yi *et al.*, 2003). Em contrapartida, ratos recém-nascidos, também têm sido utilizados para a verificação da capacidade protetora de anticorpos anti-meningococo e anti-Hib (Jarosik *et al.*, 1995, Jarosik *et al.*, 1994, Jarosik & Hansen, 1994). O modelo proposto por Alonso *et al.* (Alonso *et al.*, 2003) visa mimetizar o cenário epidemiológico das epidemias de meningite ou pneumonia os quais vem geralmente precedidos de

epidemias de gripe (Alonso et al., 2003). A primo-infecção gripal permite a implantação do meningococo e pneumococo, após sete dias de infecção viral, o que coincide com a queda dos níveis de expressão de TNF α (fator de necrose tumoral). Tal modelo tem sido também utilizado na comparação de linhagens clonais de *N. meningitidis* pertencentes a diferentes complexos clonais epidêmicos e no processo de *switching* capsular (Lancellotti et al., 2006) e nunca foi utilizado na análise da virulência de *H. influenzae*.

Para *H. influenzae*, os modelos dependem do tipo de linhagem e dos parâmetros a serem analisados. Ao que concernem as linhagens NTHi, o estudo pela infecção de chinchilas tem sido o mais utilizado (Dawid *et al.*, 1999) (Rao *et al.*, 1999). Outras metodologias têm sido também empregadas utilizando ratos recém-nascidos no teste de anticorpos neutralizantes a antígenos provenientes de *H. influenzae* (Sanders *et al.*, 1993) (Massignani *et al.*, 2003), modelos de implantes tissulares (*tissue cages*) (Vogel *et al.*, 1996) onde recombinações genéticas e o efeito de anticorpos ou agentes antimicrobianos já têm sido efetuadas (Vogel *et al.*, 1996b).

Embora modelos animais tenham sido utilizados, ainda não foi possível determinar um modelo que mimetize o mecanismo de infecção desta bactéria no hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVAS

Um ponto importante deste estudo está vinculado à particularidade natural destas bactérias em adquirir material genético exógeno e assim alterar seus mecanismos de virulência, possibilitando uma melhor adaptação. Uma preocupação crescente quanto à profilaxia a estes patógenos nos levou a analisar tais mecanismos.

Outro ponto importante é a caracterização e desenvolvimento de modelos nos quais os estudos de fatores de virulência e a fisiopatologia destas bactérias pudessem ser melhores estudados.

Além disso, a análise dos mecanismos de virulência de linhagens de *H. influenzae* biotipo *aegyptius* que ainda não são bem esclarecidas no que diz respeito a(os) gene(s) hipoteticamente adquirido(s) de linhagens de *N. meningitidis* pelo processo de transferência gênica lateral, bem como verificar a produção de quimiocinas inflamatórias envolvidas nos processos de sépsis quando *H. influenzae* não causador da febre purpura e o *H. influenzae* biotipo *aegyptius*, infectam células (*in vitro*) de Hec-1B com consequente análise destas quimiocinas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Estudar os processos de transferências horizontais de genes entre *Haemophilus influenzae* e *Neisseria Meningitidis*, tanto por recombinação intra-específica quanto nas espécies de diferentes gêneros bacterianos (intergenéricas);

Estudar os efeitos moleculares e imunológicos da patologia causada pelas bactérias *Haemophilus influenzae* e *Neisseria Meningitidis* antes e após o processo de recombinação, sob o ponto de vista das reações inflamatórias (resposta na produção de citocinas inflamatórias) e nos possíveis mecanismos de apoptose das células hospedeiras.

3.2 Objetivos específicos

- construir vetores para promover a obtenção de mutantes contendo o gene *lav* fusionado a um cassete e de resistência a eritromicina - *ermAM*;
- verificar a passagem desse gene através da construção de linhagens de *N. meningitidis* virulentas já estudadas pelo grupo para linhagens de *H. influenzae* não causadoras de febre púrpura brasileira;
- analisar nesses mutantes transferidos o perfil de citocinas inflamatórias comparando-os com linhagens de *H. influenzae* biotipo *aegyptius* causadores de febre purpura brasileira.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MEIOS DE CULTURA

4.1.1. Infusão de cérebro-corção (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).

4.1.2. Ágar Chocolate

Após esterilização do BHI ágar, a uma temperatura de 80° C, foi adicionado 5% de Sangue Desfibrinado de Cavalo.

4.1.3. Meio GC

O meio GC foi formulado nas proporções de NaCl a 5 g/L, extrato de levedura 6g/L, proteose peptona a 15 g/L, amido de batata a 1,5g/L, K₂HPO₄ a 4 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, Ágar - 15 g/L. O material foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após isso, a uma temperatura de 56 °C foi suplementado de glicose 1g/L, bicarbonato de sódio a 0,15 g/L, ácido glutâmico 0,1 g/L.

4.1.4. Meio Luria Bertani (LA e LB)

O meio foi formulado nas seguintes proporções: triptona 10g/L, NaCl 10g/L e extrato de levedura 5g/L. O meio de cultura LA e LB contém a mesma composição, eles se diferem pela presença de ágar a 15 g/L) no LA.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. LINHAGENS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Todas as linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas no presente trabalho e suas origens foram descritas na tabela 1. Para as linhagens de *Haemophilus influenzae* foram cultivadas utilizando-se ágar chocolate suplementado com hemina e NAD, nas condições, 37°C com 5% CO₂ por um período de 18-24 horas (Kilian *et al.*, 1976). Para o cultivo dos meningococos, foram utilizadas as mesmas condições, em meio GC (Thatcher *et al.*, 1969). Para o crescimento da linhagem de *E. coli* DHS α foram utilizados os meios LA e LB, dependendo da necessidade, e incubados a 37° C por 18-24 horas.

Para sua manutenção, as amostras foram suspensas em meio de infusão de cérebro-coração (BHI) ao qual foi adicionado glicerol a 30 % e mantidas a -80 ° C.

Tabela 1 – Linhagens utilizadas neste trabalho

Linhagens	Características	Origem
<i>E.coli</i> DH5a	Nal ^R utilizada como receptora de plasmídios. F-, <i>endA</i> 1, <i>hsdR</i> 17 (rk-, mk-), <i>supE</i> 44, <i>thi</i> -1, <i>gir</i> A96, <i>relA</i> 1	Hanahan et al., 1983
<i>N. meningitidis</i> C2135	Sorogrupo C, BIOMERIEUX C2135	INCQS - FIOCRUZ
<i>N. meningitidis</i> P374	Sorogrupo Y, isolado de LCR Campo Grande – RJ	INCQS - FIOCRUZ
<i>N. meningitidis</i> W135	Sorogrupo W135, ATCC35559	INCQS – FIOCRUZ
<i>N. meningitidis</i> B4	<i>N. meningitidis</i> B4: P1-16 padrão.	IAL – SP
<i>N. meningitidis</i> W135	<i>N. meningitidis</i> de referência do sorogrupo W135.	IAL – SP
RdKW20	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa padrão sequenciada completamente, do sorotipo d	INCQS – FIOCRUZ
Hi 46	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	Lancellotti et al., 2008
Hib-βlac	<i>Haemophilus influenzae</i> sorotipo b ATCC	INCQS – FIOCRUZ
Hae 254/86	<i>Haemophilus influenzae</i> biotipo <i>aegyptius</i> BPF	IAL - SP
Hae 258/86	<i>Haemophilus influenzae</i> biotipo <i>aegyptius</i> BPF	IAL – SP
Hae 284/86	<i>Haemophilus influenzae</i> biotipo <i>aegyptius</i> BPF	IAL – SP
Hae ATCC 11116	<i>Haemophilus influenzae</i> biotipo <i>aegyptius</i>	IAL-SP

IAL – Instituto Adolfo Lutz SP

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

4.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico bacteriano foi obtido após crescimento de 18-24 horas de colônias de *Neisseria meningitidis* em meio GC incubado a 37° C e atmosfera de CO₂ a 5%. Uma massa celular de aproximadamente 5mg de células foi adicionado em 400 µL de Tampão TE (Tris-EDTA) pH 8,0 em um tubo cônico de 2,0 mL. A tal mistura foram adicionados 5µL de solução aquosa de proteinase K (10mg/mL) e 100µL de uma solução aquosa de dodecil-sulfato de sódio – SDS a 10% (m/v) e incubado em banho-maria ou banho seco a 65° por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100µL de uma solução aquosa de cloreto de sódio 5M e 100µL de uma solução pré-aquecida a 65° em banho-maria ou banho seco de EDTA por 10 minutos, esfriado rapidamente a temperatura ambiente e adicionado 750µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 (utilizando capela). Foi agitado vigorosamente e centrifugado a 12000rpm à temperatura ambiente por 5 minutos. A fase aquosa superficial foi passada para novo tubo cônico de 1,5mL e a esta solução foram adicionados 0,6 vezes o volume de isopropanol à -20° C, em seguida foi verificada a precipitação do ácido nucléico e incubado à -20°C para garantir toda a precipitação do mesmo por um período de 30 minutos. Após a verificação da precipitação a solução foi centrifugada em micorcentrífuga (12000rpm/5minutos) e o sedimento ressuspendido em 100µL de tampão TE pH8,0. A absorbância foi medida à 260 e 280nm e os fragmentos foram migrados em gel de agarose à 0,7% para verificar a integridade do DNA extraído (SAMBROOK *et al.*, 1989). O mesmo protocolo foi utilizado para extração de DNA genômico bacteriano de *Haemophilus influenzae* crescido em ágar chocolate isolado de 18-24 horas incubado a 37° C e atmosfera de CO₂ a 5%.

4.2.3. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

As sequências dos genes *las* provenientes de *H. influenzae* biótipo *aegyptius* (**Hae ATCC 11116**), foram obtidas do *GenBank* *GI: 14994100* contida no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para amplificação do gene *las*, do cassete *ermAM* e das inserções desse cassete nas posições do gene utilizando o DNA genômico da linhagem *Hae11116* como DNA *molde*, foram utilizados os primers *lasiF*, *lasiR*, *lasfF* e *lasfR*, descritos na tabela 2. A amplificação do gene *las* foi realizada utilizando primeiramente a sequência inicial *lasi* e depois a sequência final *lasf*, foram amplificados separadamente devido ao tamanho do gene e por haver sequências não codificadas.

Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonucleotídeo	Sequência 5'– 3'	Referência
IL10	FW GTGATGCCCCAAGCTGAGA	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
	RV CACGGCCTTGCTCTTGTTT	
TNF- α	FW TCTTCTCGAACCCCGAGTGA	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
	RV CCTCTGATGGCACCACCAG	
GAPDH	FW TGCACCACCAACTGCTTAGC	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
	RV GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
lasi F	GAACCAAATGGCACTTTTTGTTTCAGTTTT ATGC	This work
lasi R	GCGGATCCATCTTTTAATGAATAGAATAC GGAAGCAC	This work
lasf F	GCGGATCCATGCTCGATCGAAATTCTG	This work
lasf R	CTCGACGTTTCATTGTCTATTTCACACCG	This work
ERAM1	GCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAG	(Taha <i>et al.</i> , 1998)
ERAM3	AAGCTTGCCGTCTGAATGGGACCTCTTTA GCTTCTTGG	(Taha <i>et al.</i> , 1998)

*The underlined sequences in italic are the insertion of the *Bam*HI site into original sequence

Para um volume final de 50 μ L de reação, contendo as especificações do fabricante da enzima *Taq* DNA Polimerase, foram adicionados 50 moles de cada oligonucleotídeo, 2 μ L do DNA molde, 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).

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 100 V 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 tendo-se como padrão de peso molecular o 1 Kb DNA-*ladder*. Após este procedimento, o gel foi fotografado pelo sistema *GelDoc It – Imaging System*, com filtro vermelho utilizando-se o *software VisionWorks®LS*.

4.2.4. EXTRAÇÃO PLASMIDIAL EM MÉDIA ESCALA

O método utilizado para extração de DNA plasmidial baseou-se na técnica de lise alcalina de BIRBOM & DOLI (1979). A linhagem bacteriana foi inoculada em 50 mL de meio LB (SAMBROCK et al., 1989), suplementado com antibiótico cuja marca de resistência está contida no plasmídeo, para nosso caso eritromicina a 100 mg/L e incubada sob agitação de 150 RPM a 37°C por 12-18 horas. O crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado a 5000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de solução I [glicose 50mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA a 10 mM (pH 8,0)] gelada e mantido em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, 10 mL de solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%

m/v) foram adicionados, e os conteúdos do tubo misturado por inversão suave e vagarosa. Após o tubo ter sido mantido em banho de gelo por não mais que 5 minutos, 705 mL da solução III [acetato de potássio 5M - 60,0 mL; ácido acético glacial - 11,5 mL e água deionizada - 28,5 mL], foram acrescentados ao conteúdo do mesmo e então, novamente, invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por mais 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10000 RPM por 5 minutos e 20 mL do sobrenadante transferidos para outro tubo de centrífuga com a adição de 13 mL de isopropanol 100% a -20° C. Após este procedimento, o tubo foi mantido a - 20° C por pelo menos 1 hora. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000 RPM por 5 minutos, ressuspendido em 400 µL de água deionizada e novamente precipitado, adicionando-se solução de NaCl 5 M e 1 mL de etanol 100% a -20°C. O precipitado contendo o DNA plasmidial foi lavado por centrifugação com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido com 400 µL de água MilliQ estéril. Para confirmação da eficiência da extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente para a detecção do DNA obtido por PCR.

4.2.5. TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES DE *ESCHERICHIA COLI*

4.2.5.1 Preparo de Células Competentes de DH5- α

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 100 mL de meio LB e incubadas a 37°C a 150 RPM até DO – 600 nm = 1,00. Este crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de centrífuga previamente conservado a 4°C e, o volume total de crescimento bacteriano centrifugado a 4000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 10mL de uma solução esterelizada de CaCl₂ 100 mM a 4°C. Esta suspensão foi, novamente, centrifugada à mesma velocidade acima e o sedimento recuperado assepticamente em 8 mL de uma solução de cloreto de cálcio

100 mM adicionada de 30% de glicerol esterilizado. A suspensão foi aliquotada em tubos de eppendorf (aliquotas de 500 µL) e congelada em nitrogênio líquido e, posteriormente, conservada a – 80° C (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.2.6. CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA MUTAÇÃO

4.2.6.1. Processo de Transformação do vetor pLAN78 em *Escherischia coli* linhagem DH5α

Uma alíquota de 200 µL de células competentes foi descongelada e adicionados 10µL do plasmídeo pLAN78 (plasmídeo). A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. Transcorrido esse período a mistura foi submetida ao aquecimento de 42°C durante o tempo limite de 90 segundos. Transcorrido tal tempo, o tubo de reação foi imediatamente mantido em banho de gelo por 3 minutos. Foram adicionados à mistura 800 µL de meio LB pré-aquecido a 37°C e a mesma incubada à mesma temperatura por no mínimo 1 hora. A seguir, o volume total da transformação foi selecionado em meio LA adicionado ampicilina a 100 mg/L, que é o antibiótico de resistência do plasmídeo, IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-galactopiranosídeo), nas concentrações de 0,1 mM e 30 µg/mL, respectivamente, para seleção dos clones com inserto desejado. As placas foram incubadas por 18-24 horas a 37°C, e isoladas algumas colônias de cor branca, que contém o plasmídeo desejado, logo foi submetida à extração de DNA plasmidial em média escala (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.2.6.2. Clonagem do gene *Lasi* em pGem®-T Easy (Promega) do fragmento amplificado por PCR

Primeiramente o *lasi* foi amplificado por PCR e o fragmento amplificado inserido no plasmídeo pGem®-T Easy (Promega). Para este processo foi realizado a seguinte reação:

pGem®-T Easy - 1 µL

T4 DNA Ligase (1U/ µL) - 1 µL

Fragmento purificado - 3 µL

Tampão de ligação 2X - 5 µL

A mistura foi incubada a 16° C, por um período de 16-18 horas. Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose como já descrito acima.

Após o processo, denominamos o plasmídeo com o nome pLAN75 (figura 1).

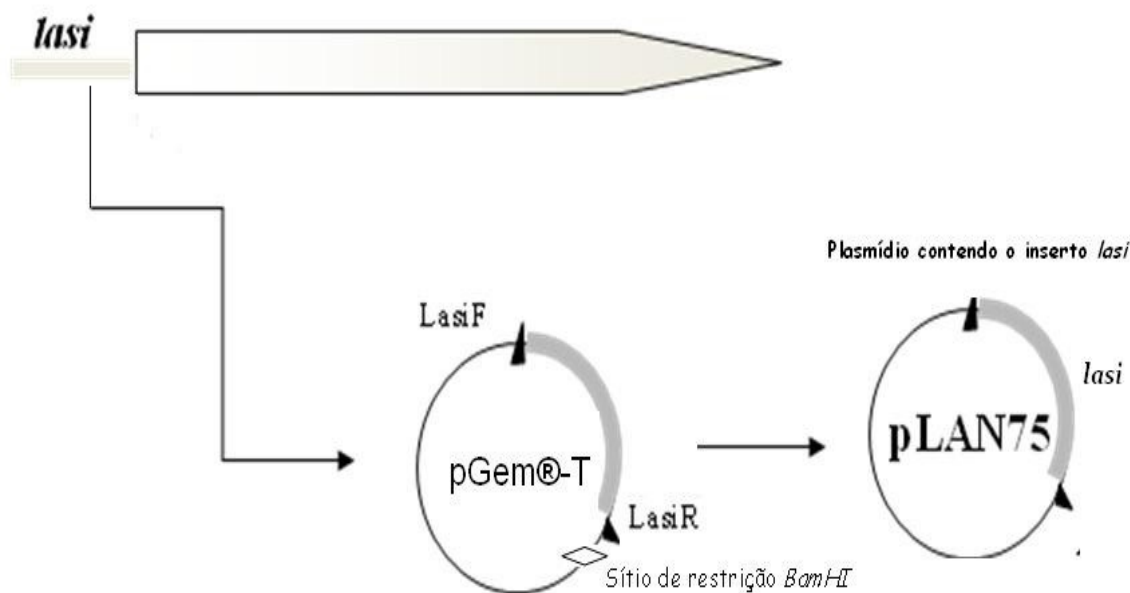


Figura 1. Construção e fusão do gene *lasi* amplificado no plasmídeo pGem®-T Easy (Promega) contendo o sítio de restrição *BamHI*, denominado **pLAN75**.

4.2.6.3. Clonagem do gene *lasf* em pGem®-T Easy (Promega) do fragmento amplificado por PCR

Para inserção do fragmento amplificado no plasmídio foi realizado a mesma reação descrita na seção anterior.

A mistura foi incubada a 16° C, por um período de 16-18 horas. Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose como já descrito acima. Após o processo, denominamos o plasmídeo com o nome pLAN76 (figura 2).

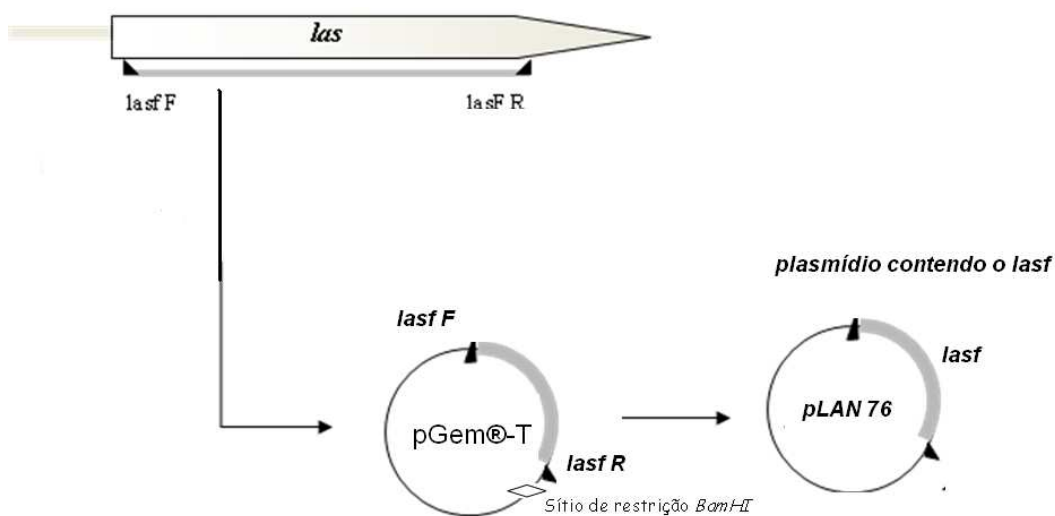


Figura 2. Construção e fusão do gene *lasf* amplificado no plasmídeo pGem®-T Easy (Promega) contendo o sítio de restrição *BamHI*, denominado **PLAN76**.

4.2.6.4. Inserção do gene de resistência a Eritromicina à fusão do gene *lasi* em pGEMT Easy

Após a fusão do gene *lasi* em pGEMT Easy (Promega), contendo o sítio de restrição *BamHI*, possibilitou a inserção do cassete *ermAM*, o qual confere resistência à eritromicina, realizada a mesma reação conforme descrita na seção 3.2.6.2. A mistura foi incubada a 16° C, por um período de 16-18 horas. Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose como já descrito acima.

Uma PCR, utilizando os primers *ERAM1* E *ERAM3*, com suas respectivas sequências nucleotídicas descritas na tabela 2, foi realizada para amplificação do gene de resistência à Eritromicina, *ermAM*, seguindo uma eletroforese em gel de agarose.

Após o processo, denominamos o plasmídio com o nome **pLAN77** (Figura 3), como demonstra a figura que segue:

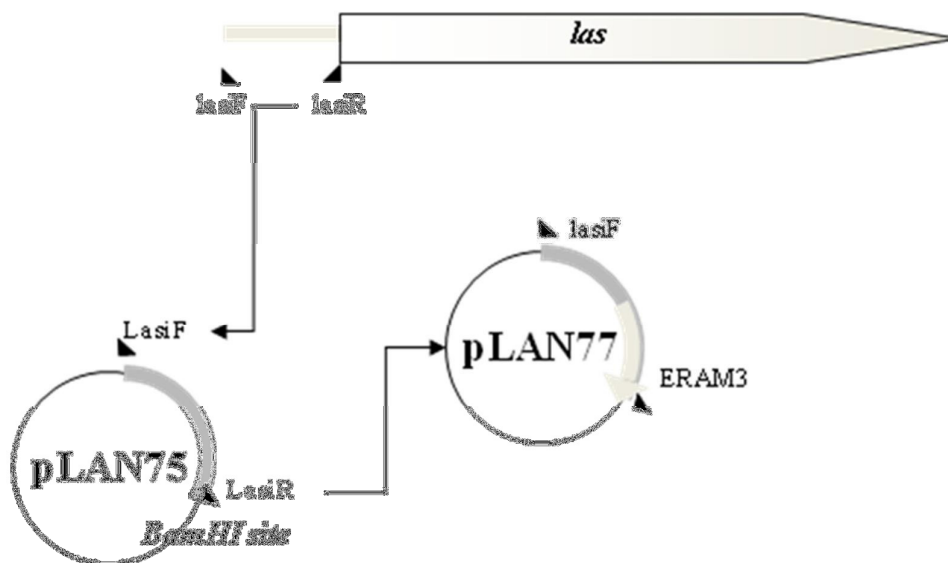


Figura 3. Inserção do cassete *ermAM* a fusão do gene *lasi* em pGEMT Easy (Promega) no sítio de restrição *BamHI*, denominado pLAN77.

4.2.6.5. Fusão do fragmento amplificado da mutação pLAN77 no pLAN76

A amplificação do gene *lasi* fusionado ao cassete *ermAM* foi realizada usando os primers ERAM3 e *lasiF*, seguindo o protocolo de amplificação descrito anteriormente. O fragmento obtido foi inserido no sítio *BamHI* do plasmídeo pLAN76 que contém o inserto do gene *lasf* gerando uma fusão transcricional, formando assim o vetor pLAN78 (Figura 4).

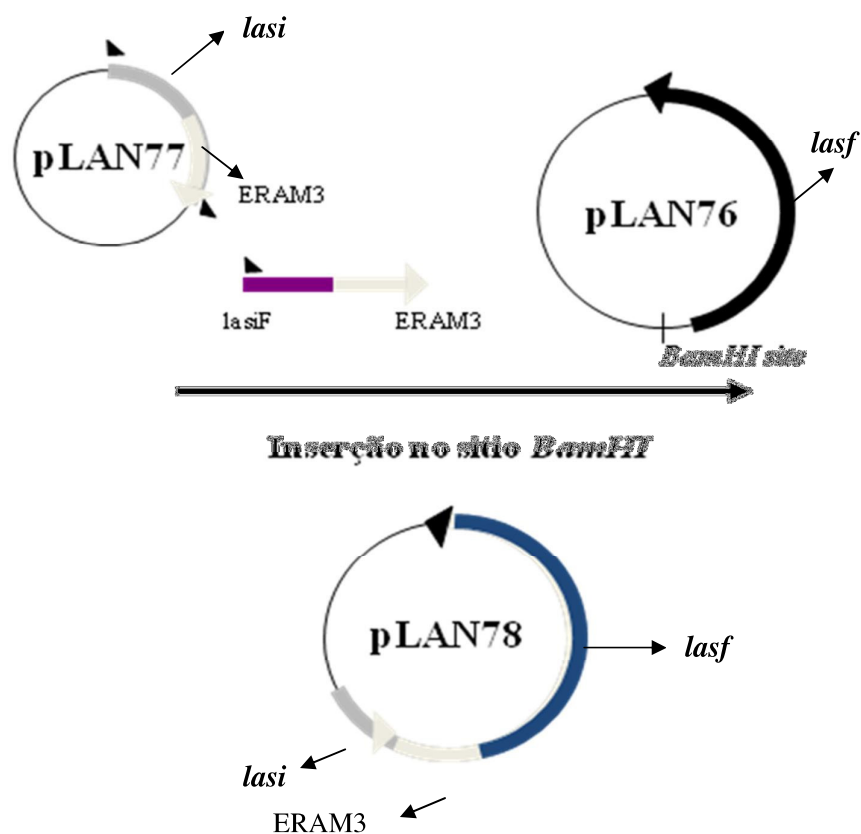


Figura 4. Gene *lasi* fusionado ao cassete *ermAM* foi inserido no sítio *BamHI* de pLAN76 contendo o *lasf*, gerando uma fusão transcricional, formando o vetor pLAN78.

4.2.7. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO DO VETOR PLAN78 EM *NEISSERIA MENINGITIDIS* LINHAGEM B4

Após a seleção e verificação dos clones com inserto desejado, o DNA plasmidial extraído foi transformado na amostra de *N. meningitidis* linhagem B4, originando a amostra **LG2** (Figura 5). O processo de transformação bacteriana segue descrito abaixo:

As bactérias crescidas em meio semi sólido e transferidas com a utilização de uma alça estéril para o meio BHI caldo suplementado com 2 µg/mL de NAD de 10 µg/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 100 µL da solução bacteriana sendo incubada com 20 µL do plasmídeo em questão na concentração de 1 µg. Incubou-se a 37°C por cerca de 30 minutos, seguindo com uma adição de 1000 µL de meio caldo BHI e nova incubação a 37° C com 5% CO₂ por um período de 3h. Transcorrido esse período, toda a mistura foi inoculada em placas de meio GC suplementado com eritromicina na concentração de 2 µg/mL (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e estas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 a 48 horas até obtenção de colônias visíveis. A verificação da aquisição do gene foi realizada por PCR nas mesmas condições da amplificação do cassete de resistência a eritromicina.

Tais mutantes obtidos foram analisados por PCR e como esquematizado na figura 5, que segue, aos mutantes contendo o gene fusionado *las::ermAM* na linhagem de *N. meningitidis* receptora B4, denominou-se LG2. Vale ressaltar que a linhagem B4 foi escolhida por apresentar alta virulência, ser portadora do gene *lav* (Pereira et al. 2011).

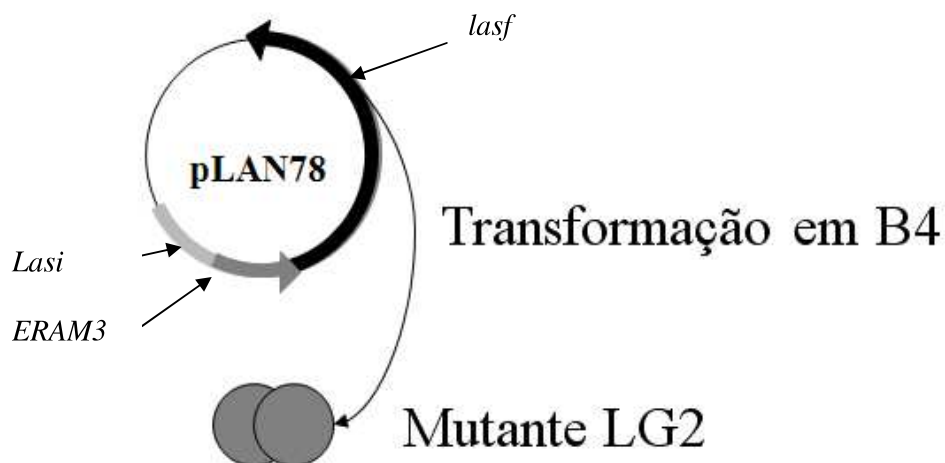


Figura 5. O DNA plasmidial clonado foi transformado na amostra de *N. meningitidis* linhagem B4, originando a amostra **LG2**.

4.2.8. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO DO DNA MUTANTE DA LG2 EM LINHAGENS DE *H. INFLUENZAE* RD E BLAC

As amostras Rd e β lac, linhagens de *H. influenzae*, consideradas não causadoras da febre púrpura brasileira e que apresentaram baixos níveis de produção de quimiocina inflamatória IL-10, foram receptoras para o DNA da amostra mutante LG2 de *N. meningitidis*, o qual apresenta o gene *las* fusionado, mimetizando assim uma transformação intergêneros bacteriana. Tal transformação, inicialmente foi realizada seguindo o protocolo descrito a seguir.

As bactérias crescidas foram transferidas com a utilização de uma alça estéril para o meio BHI caldo suplementado com 2 μ g/mL de NAD e 10 μ g/mL de hemina para o *H. influenzae* linhagens Rd e β lac numa concentração final de 1.0 de densidade óptica em um tubo eppendorf de 1,5 mL. A transformação foi realizada usando 100 μ L da solução bacteriana sendo incubada com 5 μ L do DNA genômico da cepa doadora LG2 numa concentração de 1 μ g seguida pela colocação de 100 μ L de sílica mesoporosa SBa16 na

concentração de 10⁸g por 30 min., gentilmente fornecida pela Dra. Edésia M. B. De Souza, do Centro Nacional de Energia Nuclear de Belo Horizonte - MG. Assim, 1000iL de meio caldo BHI suplementado para *H. influenzae* foram adicionados e a bactéria foi encubada a 37°C com 5% CO₂ por 18h. Depois de transcorrido tal período, todo o conteúdo da suspensão foi inoculado em BHI ágar suplementado para *H. influenzae* acrescido de eritromicina na concentração de 1i g/mL (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e foram crescidas overnight a 37°C e 5% de CO₂ atmosférico. Vale ressaltar, que tentativas sucessivas de transformação foram realizadas sem a adição dessa nanopartícula onde não houve obtenção de transformantes. Tal ocorrência será discutida na seção de Resultados e Discussão neste estudo.

Uma vez transcorrido o tempo de incubação das placas de 24 a 48 horas como descrito acima, alguns transformantes foram selecionados e testados quanto à presença do cassette de resistência à eritromicina e igualmente quanto à sua inserção na região adjacente ao gene *las* das linhagens receptoras Rd e β lac, originando assim, os mutantes finais **RdLG2** (contendo o gene da linhagem B4 fusionado ao cassette *ermAM* transferido para a linhagem de *H. influenzae* não causador de febre púrpura - Rd) e **β lacLG2** (contendo o gene da linhagem B4 fusionado ao cassette *ermAM* transferido para a linhagem de *H. influenzae* não causador de febre púrpura - β lac) . Tais mutantes são produtos da recombinação intergêneros bacterianos e seguiram para o teste de comparação, na expressão de citocinas inflamatórias frente a linhagens celulares endoteliais humanas, neste caso, a linhagem imortalizada Hec-1B, cujo experimento está descrito a seguir.

4.2.9. CULTIVO DE CÉLULAS Hec-1B (endotélio de endométrio humano)

Células Hec-1b (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% de Soro Fetal Bovino (v/v) (SFB), e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Após a confluência da monocamada celular, as células foram tripsinizadas e distribuídas em placas de 24 orifícios. A concentração celular obtida após a tripsinização foi de 1.10^6 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.

4.2.10. TESTE DE INFECÇÃO EM CÉLULAS

Após a confluência da monocamada celular, tais células foram tripsinizadas e distribuídas em uma placa de 24 orifícios, cada um contendo uma alíquota de 1ml da suspensão celular. A placa em questão foi imediatamente incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante o período de 48 horas.

As linhagens de *H. influenzae* Rd e β lac após serem semeadas em meio ágar chocolate e incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, foram ressuspensas em meio RPMI1640. Tal suspensão bacteriana continha aproximadamente 1.10^6 UFC/ml. Na placa com a suspensão celular, foram adicionadas em cada orifício alíquotas contendo aproximadamente 1.10^6 UFC de meningococos em meio RPMI1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Assim, após 5 horas de incubação a 37°C em atmosfera de 5%, os orifícios da placa contendo a suspensão celular e bacteriana foram lavados cinco vezes com PBS pH7,4. O conteúdo de cada orifício foi raspado com uma ponteira de micropipeta e

deste foi obtida uma alíquota de 100 µl, a qual foi plaqueada, em triplicata, em meio ágar chocolate e incubada por 16-18 horas a 37°C em atmosfera de CO₂.

4.2.10.1 Ensaio de Adesão

O teste de adesão em células Hec-1B foi baseado na metodologia descrita por Scalestky et al. (1984) e foram infectadas com as seguintes linhagens bacterianas: *N. meningitidis* B4, C2135, *Hi* Rd, *Hi* Blac, *Hae* 254, *Hae* 258, *Hae* 284, os mutantes RdLG2 e BlacLG2.

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. Para determinar a quantidade de UFC de bactérias utilizadas em cada teste de adesão, um volume também de 50 µL placa teste de células e bactérias foi incubada a 37 °C por 3 horas e esta foi encaminhada a duas análises diferentes: percentual de adesão e perfil de expressão de quimiocinas inflamatórias. A metodologia utilizada para tais análises estão descritas nos tópicos seguintes.

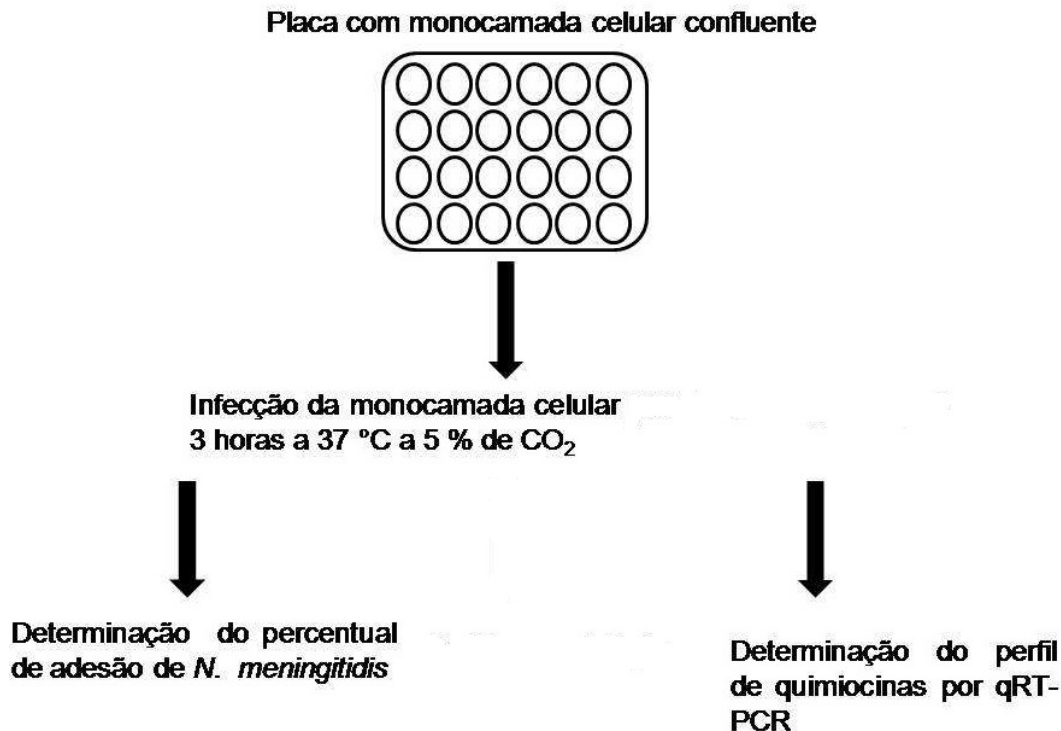


Figura 6. Esquema representativo da metodologia em comum para a obtenção do percentual de adesão de *N. meningitidis*, *Hi* e *Hae* e determinação do perfil de expressão de quimioquinas inflamatórias em células (Hec-1B) submetidas à infecção.

4.2.10.2 Caracterização do percentual de adesão em linhagem celular Hec-1B

O percentual de adesão de diferentes linhagens (*N. meningitidis* B4, C2135, *Hi* Rd, *Hi* Blac, *Hae* 254, *Hae* 258, *Hae* 284, os mutantes RdLG2 e BlacLG2) na linhagem Celular de Hec-1B foi obtido através da metodologia descrita abaixo:

- Infecção da monocamada celular 3 horas a 37° a 5% de CO₂;
- Descarte do meio de cultura celular;
- Lavagem da placa com células 5 vezes com RPMI 1640 seguida do descarte do meio de cultura novamente;
- Adição de 1 mL de RPMI 1640 a cada poço da placa;
- Raspagem do fundo de cada *well* com uma ponteira de micropipeta estéril;

- Plaqueamento de 50µl de *well* em placa de ágar chocolate estéril em triplicata;
- Incubação das placas de ágar chocolate 16-18 horas a 37°C a 5% de CO₂;
- Contagem da UFC das placas de Agar chocolate.

É interessante ressaltar que a lavagem da placa contendo a cultura celular após o período de infecção foi realizada a fim de eliminar as bactérias que não aderiram nas células.

Após a obtenção do número de UFC de cada placa de ágar chocolate, calculou-se o percentual de adesão de cada linhagem utilizada.

4.2.11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS INFLAMATÓRIAS

4.2.11.1. Extração de RNA

Células de Hec 1-b cultivadas em placas de 24 *wells* foram submetidas ao processo de infecção por amostras de *H. influenzae* linhagem Rd e βlac. Após um período de 3 horas, o meio de cada *well* foi retirado. A cada orifício, foi adicionada a alíquota de 300 µL de Trizol Reagent® (Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, USA) e com o auxílio de uma ponteira de micropipeta estéril, o conteúdo total de extração de cada *well* foi retirado e transferido para um eppendorf de 1,5 mL RNase free.

Cada amostra recebeu um volume de 200 µL de clorofórmio, agitada e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras, então, foram centrifugadas a 10000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Após a centrifugação, houve a formação de 3 fases em cada eppendorf: uma fase superior aquosa com RNA, uma interface e outra orgânica, ambas com DNA e proteínas. A fase que continha RNA foi transferida para um novo eppendorf de RNase free. Adicionou-se uma alíquota de 500 µL de isopropanol a cada tubo e estes foram

incubados a -20 °C por 30 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm a 4 °C por 10 minutos e, posteriormente, os sedimentos foram lavados com 500 µL de etanol 70 %. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000 rpm em um período de 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após a evaporação do álcool, os pellets foram ressuspensos em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato 0,01 % v/v) e conservado à -80 °C.

O mesmo procedimento para extração do RNA, foi realizado utilizando as amostras *H. influenzae* linhagem Hi 46, a amostra de *N. meningitidis* linhagem B4, amostras de *H. influenzae* biótipo aegyptius (Hae 284, Hae 254 e Hae 258), as mutantes (LG2, RdLG2 e βlacLG2).

4.2.11.2. Dosagem de quimiocinas inflamatórias por PCR em tempo real quantitativo (qRT – PCR).

Uma quantidade de 0,3 µg de RNA extraído foi submetido à reação de PCR em tempo real quantitativo, utilizando oligonucleotídeos para genes endógenos para GAPDH e como genes alvo TNFα e IL-10 (oligonucleotídeos descritos na tabela 2). Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit qRT – ONE STEP- SuperScript III (Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, USA) e para a reação de quantificação relativa o 2X SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, WA, UK).

As reações foram efetuadas em placas de 96 poços no ONE STEP PLUS (Applied Biosystems), nas condições de 50 °C/15 min. (para a ação da transcriptase reversa), seguindo de 45 ciclos de 95 °C/15 seg, 60 °C/1 min., de acordo o meio de reação abaixo descrito:

Master Mix SYBR Green 2X - 5 µl

qRT – ONE STEP- SuperScript III - 0,25 µl

Primer Forward (concentração final 400 μ M)- 0,08 μ l

Primer Reverse (concentração final 400 μ M)- 0,08 μ l

RNA extraído (concentração final de 30 ng) - 1 μ l

H₂O DEPC q.s.p. - 10 μ l

A análise dos resultados foi realizada pelo método de comparação de expressão do gene endógeno GAPDH, de tal modo que o Ct (*threshold cycle* – ciclo no qual a fluorescência emitida pelos produtos da reação de amplificação passa a ser estatisticamente significativa) do gene alvo de cada quimiocina (início do ciclo de amplificação de cada gene) foi comparado ao Ct obtido do controle negativo celular do gene endógeno não infectado, gerando o Δ Ct o qual foi subtraído do Ct obtido de cada gene de quimiocina de células infectadas por diferentes linhagens bacterianas, gerando assim o valor de $\Delta\Delta$ Ct. A razão da expressão desses valores é expressa nos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que fornece a expressão de cada quimiocina expressa em cada tipo celular frente à infecção bacteriana.

Outros genes para a verificação da expressão de citocinas inflamatórias também foram estudados, como os genes para IL1 β e TGF β . Contudo, a expressão dos mesmos não foi detectada em nenhum tratamento das células Hec-1B frente à infecção bacteriana, e por isso tais resultados não foram expressos.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

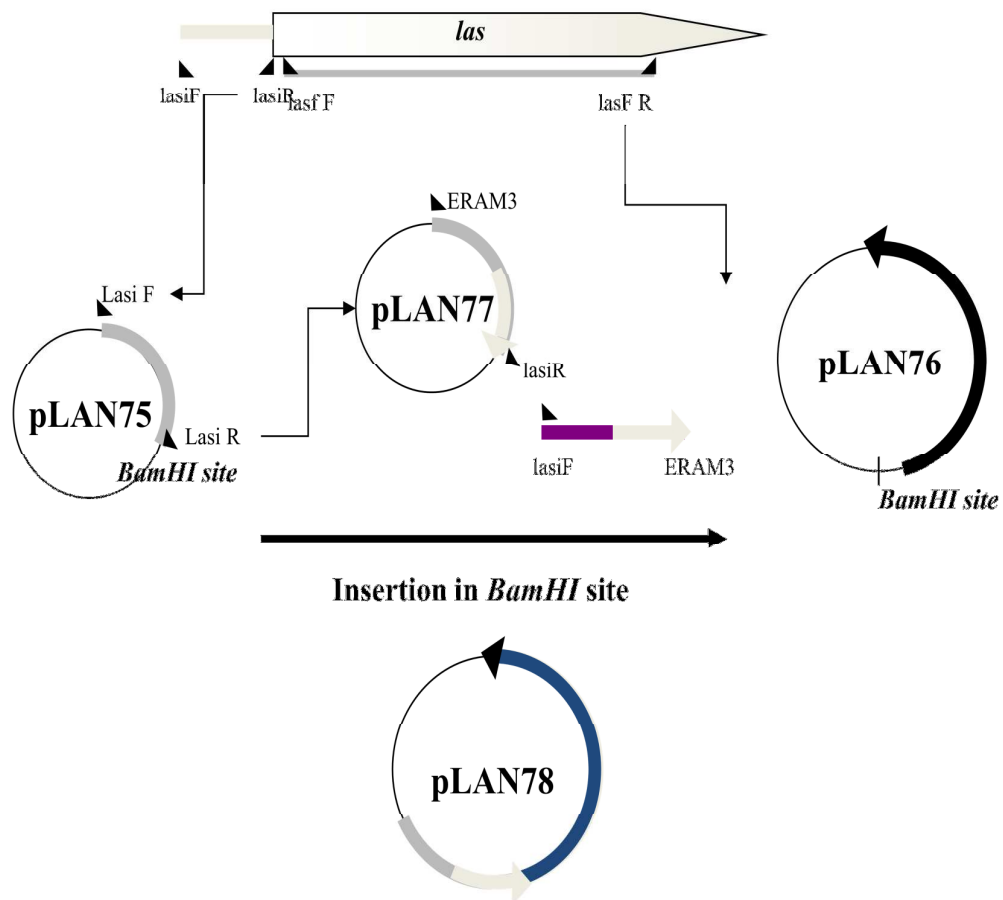


Figura 7. Processo de construção e fusão dos genes *lasi* e *lasf* em pGEMT easy e inserção do cassete de resistência à eritromicina *ermAM* , originando o plasmídeo pLAN78.

5.1. Seleção e verificação dos clones (mutantes)

A seleção e verificação dos clones com inserto desejado, foi possível devido à inserção do cassete de resistência a eritromicina o *ermAM* originando o pLAN78, que após ser transformado em *Escherischia coli* linhagem DH5 α permitiu a seleção das colônias que continham o plasmídeo desejado. Assim o DNA plasmidial foi extraído e transformado na amostra de *N. meningitidis* linhagem B4, originando a amostra mutante **LG2**.

Com esses experimentos verificamos a ocorrência da transferência lateral artificial entre linhagens de *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* realizada utilizando o DNA extraído do mutante LG2 e as cepas receptoras Rd e β lac, linhagens de *H. influenzae* não causadoras de febre púrpura brasileira.

A obtenção desses mutantes só foi possível mediante a utilização de nanopartículas (sílica) uma vez que os experimentos das transferências supra citados não produziam mutantes quando os mesmos eram inoculados em meio contendo eritromicina a 1 μ g/mL.

A obtenção dos mutantes nestas condições nos indica uma influência ambiental nos processos de transformação bacteriana tanto do gênero *N. meningitidis* quanto do gênero *H. influenzae*. Como descrito nos trabalhos descritos por Hollanda et al. (2011) e Mattos et al. (2011) a existência de nanopartículas na atmosfera protege o DNA doador da ação de DNAses corpóreas e ambientais conservando genes que podem estar envolvidos com a virulência destes organismos que tem como porta de entrada principal, o aparelho respiratório humano.

Ainda, tal processo de transferência lateral de genes é tema para grandes abordagens de estudos futuros tanto em linhagens de *N. meningitidis* quanto para linhagens de *H. influenzae*. Em estudos de transferência de genes de resistência a antibióticos mediado por nanopartículas de carbono, especificamente óxido de grafeno (dissertação de

mestrado da aluna Júlia Nogueira Varela), verificou-se que em algumas linhagens de *H. influenzae* o processo de aquisição de resistência a antimicrobianos, mediado por genes relacionados à modificação de porinas de membrana externa desta espécie bacteriana, apresenta-se significativamente aumentado quando em contato com esse tipo de nanoestrutura.

Comparando-se essas nanoestruturas a zonas onde os processos de transferência lateral de genes entre as bactérias *N. meningitidis* e os casos de surtos de febre púrpura brasileira verifica-se uma colocação de eventos epidêmicos em áreas de convergência de ventos carregados com nanopartículas de sílica como é o caso da África\subsaária, considerada cinturão africano da meningite, por causa do *ramarthan*, e adquirem a doença meningocócica. O vento do deserto carregado de areia ou a fuligem decorrente da prática hoje contraindicada, da queimada da agroindústria açucareira (presente no interior do Estado de São Paulo e historicamente presente na região de Ribeirão Preto onde as linhagens de *H. influenzae* biotipo causadores da febre púrpura brasileira foram primeiramente isolados na década de 80) sugerem que as nanopartículas estejam associadas aos processos de transferência lateral de genes entre bactérias (*H. influenzae* e *N. meningitidis*).

Focalizando mais no processo de aquisição molecular de fatores de virulência, corroborativos para a instauração do quadro de febre púrpura por linhagens de *H. influenzae* biotipo *aegyptius* anteriormente envolvidas somente em casos de conjuntivite, verifica-se a importância de estudos da fisiopatologia ligada à resposta celular e tumoral do hospedeiro frente a infecções destes microrganismos.

O processo de transferência do gene *las* foi verificado através de amostras resistentes à eritromicina (Rd e β lac). Ambas as amostras receptoras do DNA mutante contendo o gene *lav* fusionado a um gene de seleção o cassete *ermAM*.

5.2 Análise da expressão de quimiocinas TNF α e IL-10 em células Hec-1B

Ao que tange a avaliação do perfil de expressão de quimiocinas por qRT-PCR em monoculturas celulares, especificamente na expressão de quimiocinas inflamatórias em células endoteliais humanas (Hec-1B), a existência e a obtenção desses mutantes fusionados através de processos de transferência lateral inter gêneros bacterianos, ou seja, de um doador meningocócico para um receptor *H. influenzae* não causador de febre púrpura, é uma ferramenta essencial para o entendimento dos processos moleculares desta patologia.

No entanto, as características fenotípicas destas linhagens somente poderão ser realmente certificadas com clareza e maior certeza quando da instauração de um modelo *in vivo* da febre púrpura causada pelo *H. influenzae* biotipo *aegyptius* (Hae – BFP).

Contudo, poucos ou quase nenhum modelo animal para o estudo dessa patologia foi criado e não é foco principal deste estudo, deixando tal tarefa para perspectivas futuras. A figura que segue demonstra as principais vias de ativação imunológica de *N. meningitidis*. Vias estas, que não foram citadas anteriormente por não ser o foco deste estudo.

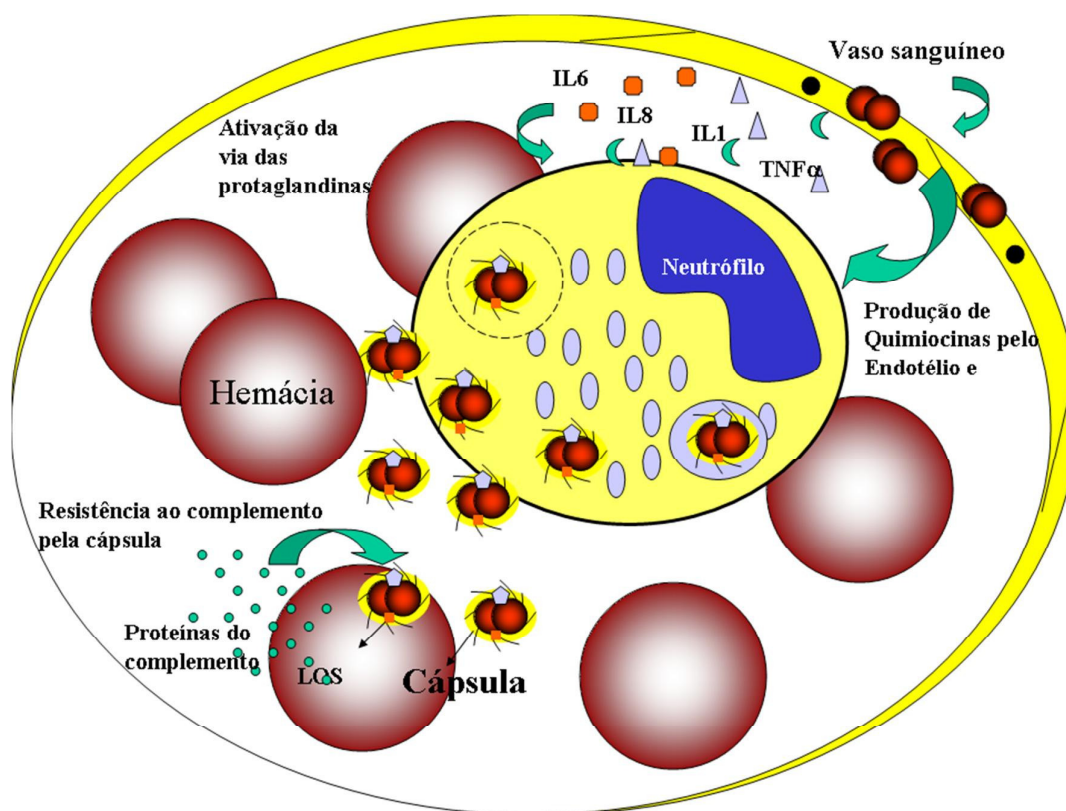


Figura 8 – Modelo esquemático e *purpura fulminans* causado por *N. meningitidis*.

Baseando-se nos processos fisiopatológicos das principais vias de ativação imunológica de *N. meningitidis* iniciou-se a análise das citocinas inflamatórias usuais responsáveis pelo choque séptico, ou *purpura fulminans*.

Vale lembrar, que em teoria o fluxo gênico que culminou no surgimento de cepas *Hae* – BFP foi decorrente de meningococo para *H. influenzae*, originando cepas septicêmicas similares às cepas virulentas de *N. meningitidis* (Lancellotti et al., 2006, Hollanda et al., Zarantonelli et al., 2008).

Portanto, as pesquisas relacionadas às quimiocinas inflamatórias deste estudo basearam-se primariamente naquelas apresentadas em infecções causadas pelo meningococo. Desta maneira, a dificuldade de modelos *in vivo* ainda se agrava já que o meningococo não possui modelos animais que totalizem todo ciclo infeccioso tal qual ocorre no ser

humano. Mesmo com a existência de modelos *in vivo* mimetizando a infecção parcial por meningococos, não existe um modelo capaz de mimetizar todos os pontos da infecção meningocócica, tais como a passagem pulmonar – endotelial (não há nenhum modelo estabelecido sendo que os que mais se aproximam são os descritos por Alonso et al., 2003 (Alonso et al., 2003, Zarantonelli *et al.*, 2007), passagem da barreira hemato-encefálica e instauração do quadro clínico meningocócico (Johansson *et al.*, 2003, Johansson *et al.*, 2005).

Em *Hae-BFP* esses modelos ainda são mais escassos ou inexistentes já que se desconhece até o presente estudo a resposta imunológica do hospedeiro em relação à infecção por esta bactéria. Por esse motivo, os experimentos iniciaram com a indução da expressão de citocinas inflamatória como IL1 β , IL10, TNF α e TGF β , baseando-se nos quadros de choque séptico causados por *N. meningitidis*, em cultura de células nas condições *in vitro* buscando um melhor entendimento deste processo, mesmo que de uma maneira inicial.

A expressão tanto de IL1 β quanto de TGF β não foi detectada através das análises realizadas em Hec-1B e por isso não foram incluídas neste estudo. Todavia o perfil de expressão das quimiocinas IL10 e TNF α não somente foram detectadas quando diferencialmente quantificadas ao que diz respeito às linhagens tanto de meningococos, *H. influenzae* não causadores de BFP, quanto das cepas *Hae-BFP* e dos transformantes provenientes da transferência gênica lateral *N. meningitidis* – *H. influenzae* não BFP.

Os perfis de expressão de tais moléculas para cada tipo celular estão representados na figura 11 que segue abaixo:

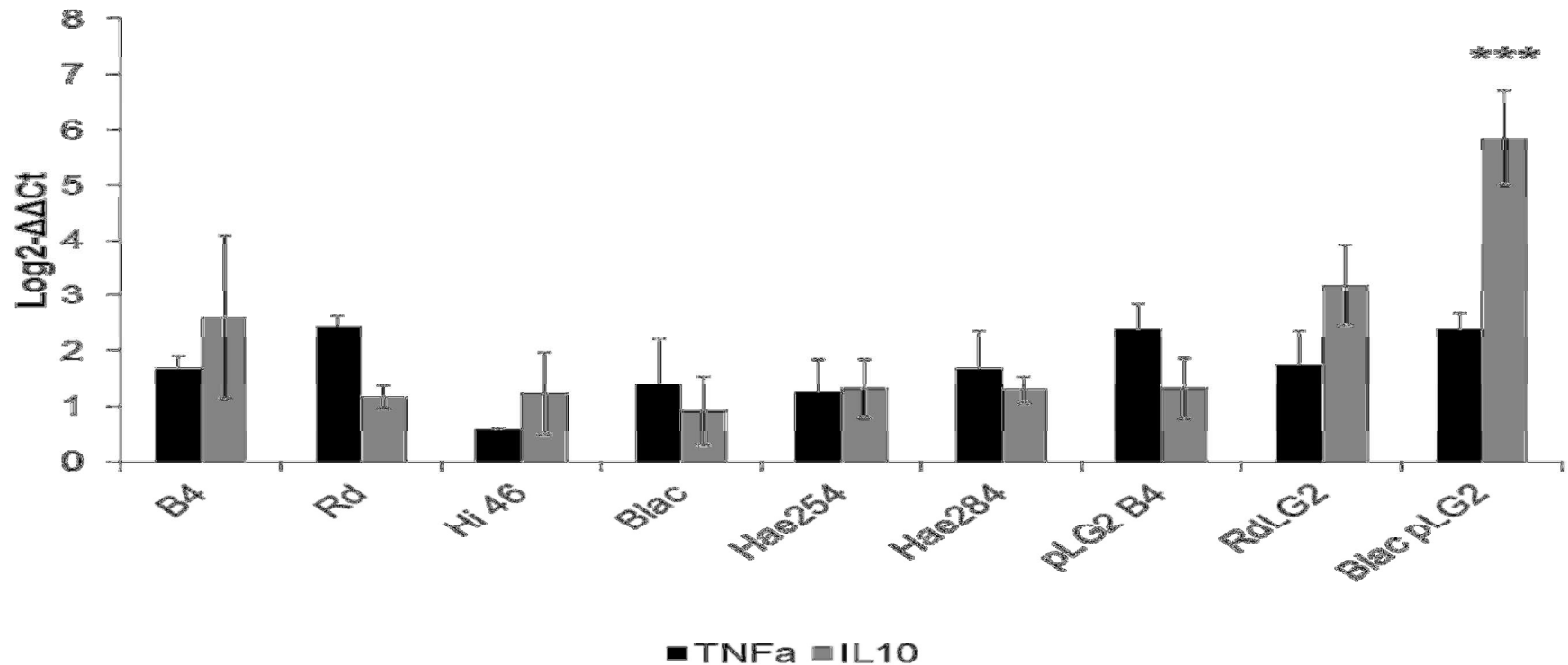


Figura 9. Avaliação da expressão de quimiocinas em células Hec-1b: Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ da quantificação da expressão das quimiocinas IL-10 e TNF- α nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, B4, *H. influenzae* Rd, Hi 46, Blac, *H. influenzae* biótipo *aegyptius* Hae 254, Hae 284 e as mutantes LG2, Rd LG2 e Blac LG2. **** Teste de Tukey mostrando valor de $P=0,0098$ quando comparado com valor de IL10 produzido pela cepa β lac selvagem, sendo considerado muito significativo ($P \leq 0,05$).

Sabe-se que o processo de infecção por *N. meningitidis* e *H. influenzae* esta associado à expressão de determinadas quimiocinas inflamatórias. Portanto, à análise dos resultados foi realizada pelo método de comparação de expressão do gene endógeno GAPDH, de tal modo que o CT (threshold cycle – ciclo no qual a fluorescência emitida pelos produtos da reação de amplificação passa a ser estatisticamente significativa) do gene alvo de cada quimiocina foi comparado ao CT obtido do controle negativo celular (gene endógeno não infectado), gerando o CT do qual foi subtraído do CT obtido de cada gene de quimiocina de células infectadas por diferentes linhagens bacterianas. Gerando assim, valores para cada quimiocina expressa em cada tipo celular, frente à infecção bacteriana.

Verifica-se na figura 11, que mostra a comparação da produção de quimiocinas por Hec-1B infectadas por *Haemophilus influenzae* e transformantes biotipo *aegyptius* que causam a febre púrpura brasileira, o aumento na expressão da quimiocina inflamatória IL-10 e os níveis de expressão de TNF α nas bactérias transformadas utilizando a amostra doadora B4 – (LG2) em linhagens receptoras β lac e Rd, o que indica a influência do gene *lav* na aquisição da resposta imune em células de Hec-1B.

Analisando mais profundamente tais resultados, verifica-se que na linhagem de *N. meningitidis* B4 e na doadora LG2, os níveis de TNF α estão aumentados em vários log's de expressão em relação à expressão do controle endógeno GAPDH das células Hec-1B infectadas. O aumento de IL-10 também pode ser verificado na linhagem B4 de *N. meningitidis*. Contudo em linhagens de *H. influenzae* não causadores de febre púrpura brasileira Rd, Blac e Hi46 constata-se o aumento de TNF α e não se verifica um aumento expressivo de IL10 como verificado nas linhagens de *N. meningitidis* e nos mutantes transformados RdLG2 e bLacLG2. As linhagens de *H. influenzae* causadores de febre púrpura brasileira, *Hae254* e *Hae284*, não demonstraram níveis de expressão

de THF α significativos quanto os níveis de IL10, sendo similares aos apresentados nas linhagens *H. influenzae* não causadoras de febre púrpura. É importante citar, que as linhagens de *Hae*-BFP deste trabalho foram adquiridas liofilizadas do Instituto Adolfo Lutz após mais de 25 anos do surto epidêmico da febre púrpura no Estado de São Paulo. É de conhecimento microbiológico que linhagens liofilizadas perdem características de virulência após sucessivos repiques e/ou liofilizações. Por tal motivo, é provável que a expressão de fatores de virulência existentes no momento do surto em 1986 na região de Ribeirão Preto foram maiores que os transformantes β lacLG2 recentemente recombinados e conservados em ultra congelamento que conserva os mecanismos de virulência e quaisquer estruturas genéticas e epigenéticas envolvidas numa patologia. Tais fatores de influência merecem estudos futuros quanto à regulação dos genes de virulência (*lav* ou outros) através de experimentos de variação de fase, sequenciamento de genomas das linhagens *Hae*-BFP ou ambos os processos realizados através da inativação da expressão de genes candidatos identificados *in silico*.

5.3 Análise da adesão em células Hec-1B

Ainda, vale ressaltar que uma contagem prévia do número de bactérias aderentes à monocamada celular de Hec-1B também foi determinado buscando elucidar a influência da adesão destas bactérias a tais células e seu efeito sobre a morfologia celular. As figuras que seguem mostram o número de UFC obtidas para uma infecção de 1.10^6 UFC de cada linhagem deste estudo. Verificou-se que o transformante β lacLG2 obteve o maior número de colônias aderidas às células Hec-1B do que qualquer outra linhagem testada neste estudo como podemos verificar na tabela 3 que segue.

Tabela 3 – Adesão das linhagens de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Hae* – BPF em células Hec-1B período de 5 horas de infecção

Linhagem	Número de UFC/1.10 ⁶ bactérias inoculadas	P* em relação ao controle mutado
B4	16,3±0,88	NA
C2135	13,3±3,93	NA
Rd	142,7±31,013	*
βlac	292±14,74	*
Hae 254	34,0±7,21	NA
Hae 258	73,3±18,1	NA
Hae 284	70,0±16,1	NA
RdLG2	313,0±9,1	0,0062
βlacLG2	1290,67±135,2	0,0018

Como verificado na tabela 3, os mutantes transformados RdLG2 e βlacLG2 apresentaram um aumento significativo da adesão quando comparados com a cepa original Rd e βlac (linhas em cinza e azul claro).

Também no teste de adesão, o efeito da infecção sobre a morfologia celular de Hec-1B (imagens não apresentadas) não demonstrou mudanças significativas durante as 5 horas de infecção em nenhuma das linhagens celulares apresentadas quando infectadas pelas linhagens de *N. meningitidis* B4 e de *H. influenzae* não causadores de febre púrpura brasileira. Contudo, não se descarta a possibilidade de uma indução de apoptose provocada pela adesão destas linhagens que pode ser provocada *in vivo* ou ainda algum

processo de passagem através de barreiras pulmonares – endotelial- que pode ser o motivo do processo patológico causado pelas linhagens *Hae-BFP*.

Além da febre púrpura brasileira, pouco se sabe a respeito da resposta imune relacionada à colonização meningocócica e/ou por *H. influenzae*, respectivamente doadores e receptores desse processo de transferência gênica lateral. Sabe-se que diversos membros do gênero *Neisseria* compartilham diversos antígenos, assim, acredita-se que seja possível adquirir imunidade natural contra *N. meningitidis* através da colonização de espécies comensais, como *N. lactamica* (Robinson et al., 2002). Há ainda a influência de mecanismos ambientais como nanoestruturas suspensas na atmosfera, mecanismos de transferência específica de genes de virulência, como os genes do operon *syn* em meningococo. Mas nada se conhece, de fato, sobre os mecanismos de transferência lateral de genes de *N. meningitidis* para *H. influenzae*, principalmente devido à escassez de modelos miméticos *in vivo*.

Contudo, através de experimentos *in vitro*, sabe-se que a quimiocina TNF α é uma quimiocina relacionada ao choque séptico e sua liberação ocorre logo no começo deste processo fisiopatológico em *N. meningitidis* e *H. influenzae*, a liberação de TNF α vem acompanhada da liberação de IL-10, uma quimiocina anti-inflamatória, que ao ser liberada pode ser capaz de inibir moléculas como TNF α , podendo ocorrer uma septicemia (Wong et al., 1989, Martire-Greco et al., Wharton & Reid, 1998, Brown et al., 1998, Deghmane et al., 2009, Arditi et al., 1993, Caputo et al., 1992, Zhu et al., 2002, Zaga-Clavellina et al., 2007). Em trabalhos publicados recentemente, verifica-se o envolvimento de IL10 no quadro de sépsis que é produzido pelo lipooligossacáride (LOS) de *Neisseria meningitidis*. Os processos de transferências gênicas laterais produzidas neste estudo, demonstraram que fatores de virulência presentes em linhagens de *Neisseria meningitidis* e relacionadas com a expressão de proteínas autotransportadoras envolvidas na síntese de LOS nestas

bactérias, são as responsáveis prováveis do quadro patológico da febre púrpura brasileira.

As células Hec-1B, quando infectadas por β lacLG2, foram capazes de simular o início da meningococcemia por apresentarem uma alta liberação de TNF- α acompanhada pela liberação de IL-10, ambas quimiocinas descritas na literatura como envolvidas no quadro septicêmico causado por *N. meningitidis* (Wong *et al.*, 1989, Martire-Greco *et al.*, Wharton & Reid, 1998, Brown *et al.*, 1998, Deghmane *et al.*, 2009, Arditi *et al.*, 1993, Caputo *et al.*, 1992, Zhu *et al.*, 2002, Zaga-Clavellina *et al.*, 2007).

Desta maneira, a confirmação da hipótese da transferência gênica lateral de genes de meningococo, como o *lav* [(que seriam doadores de genes autotransportadores concordando assim com o trabalho proposto por Davis *et al.* (2001)], levaria a proposição de um modelo, ainda que incipiente, da infecção e da fisiopatologia das linhagens *Hae* – BPF (Davis *et al.*, 2001).

Neste modelo, o gene codificante do autotransportador lipídico proveniente de linhagens de meningococo (nesse caso o gene *lav*) presente na orofaringe de pessoas submetidas a déficits imunitários e/ou partículas na atmosfera como fuligem decorrente da queimada de cana, estando protegido poderá transformar linhagens de *Haemophilus influenzae* pertencentes ao biotipo *aegyptius* ou não. Tal gene, uma vez recombinado no genoma destas linhagens receptoras (*Haemophilus influenzae* pertencentes ao biotipo *aegyptius* ou não), o efeito do autotransportador recebido de linhagens meningocócicas poderá atuar na infecção de células endoteliais do hospedeiro, onde tais corpos bacterianos estariam aderidos, produzindo LOS similar ao de *N. meningitidis* podendo causar o sepsis, purpura fulminans ou doença meningocócica como demonstra a figura 12 que seguem abaixo.

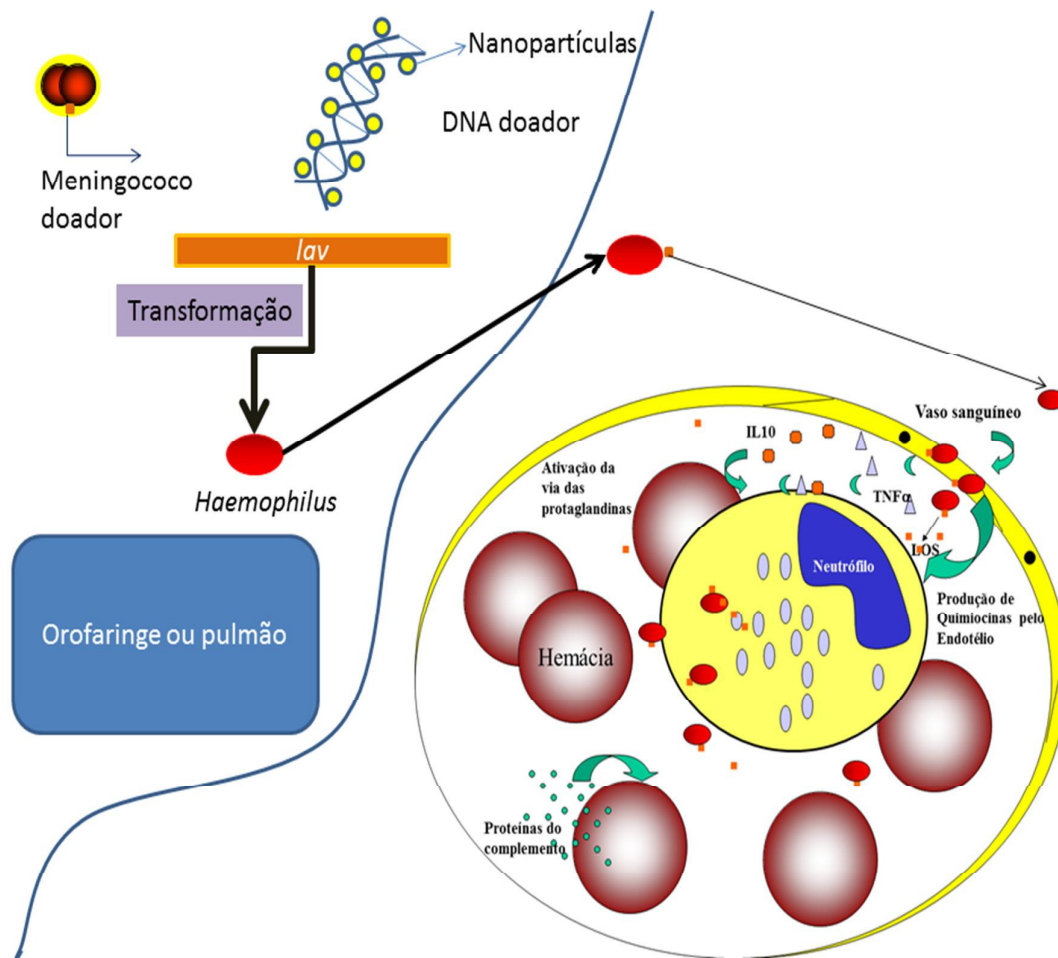


Figura 10 – Modelo de recombinação para a origem das linhagens de *Haemophilus influenzae* biotipo *aegyptius* causadores de febre púrpura brasileira – Hae - BPF.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos deste trabalho podemos concluir que:

- o gene *lav* pode ser transferido de linhagens de *N. meningitidis* para linhagens de *H. influenzae*;
- o processo de recombinação do gene *lav* e sua transferência entre dois gêneros bacterianos são raros e pode ser mediado pela ação de nanopartículas em suspensão nos ambientes naturais. Tais resultados podem ser comprovados pelo êxito da obtenção de mutantes de *H. influenzae* do gene *las* somente na presença de nanopartículas de sílica mesoporosa;
- o processo de transferência do gene *lav* proveniente da linhagem B4 de *N. meningitidis* para linhagens de *H. influenzae* não causadores de febre púrpura brasileira Rd e Blac podem produzir cepas recombinantes que promovendo um aumento significativo dos níveis de expressão das quimiocinas inflamatórias TNF α e IL10.
- os níveis de expressão tanto de TNF α quanto de IL10 apresentam-se maiores nos recombinantes obtidos pelo processo de transferência lateral de genes do que quando comparados aos níveis de expressão de linhagens de *Haemophilus influenzae* biotipo *aegyptius* causadores de febre púrpura (Hae-BFP). Tal evidência pode estar relacionada ao estado de conservação das linhagens Hae-BFP (liofilizadas) e com a perda de expressão dos fatores de virulência das mesmas em condições *in vitro*.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho decidimos focalizar os estudos somente no gene *lav* de *N. meningitidis* e no gene *las* de *H. influenzae* biótipo *aegyptius*, deixando a sequência NMB0419 para estudos futuros. Portanto, verificar a ação das construções de fusão transcripcional do gene NMB0419 e sua transferência do meningococo para linhagens de *H. influenza* é uma das perspectivas que apresentamos para futuros estudos.

Bem como:

- estudar os mecanismos de ação imunológicas do(s) lipopolissacarídeo(s) das linhagens transferidas de *H. influenzae* purificados e caracterizados quimicamente; estudar das linhagens de *H. influenzae* contendo genes transferidos provenientes de *N. meningitidis*;
- estudar os processos de adaptação e epigenética bacteriana que determinam a expressão e instauração do quadro de choque séptico de linhagens recém recombinadas frente a linhagens cuja expressão dos genes de virulência já estão inativos por sucessivas passagens em meios de cultura e *in vitro*;
- promover a inativação da expressão do gene *las* e o estudo de suas funções em linhagens *Hae* causadoras de febre púrpura;
- promover a verificação/quantificação da ação de nanopartículas sobre o processo de transferência lateral entre o meningococo e linhagens de *H. influenzae*;
- realizar estudos *in vivo* de todo(s) o processo(s) de transferência inter gênero bacterianos em modelos animais e propor modelos que possam mimetizar o processo de infecção e a patologia causada por essas linhagens contendo genes de linhagens meningocócicas conhecidas como hiper virulentas;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1985) Preliminary report: epidemic fatal purpuric fever among children--Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **34**: 217-219.
- (1986) Brazilian purpuric fever: *Haemophilus aegyptius* bacteremia complicating purulent conjunctivitis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **35**: 553-554.
- (1987) Brazilian purpuric fever: epidemic purpura fulminans associated with antecedent purulent conjunctivitis. Brazilian Purpuric Fever Study Group. *Lancet* **2**: 757-761.
- (2003) Meningococcal meningitis. *Indian J Med Sci* **57**: 369-372.
- Alonso, J. M., A. Guiyoule, M. L. Zarantonelli, F. Ramisse, R. Pires, A. Antignac, A. E. Deghmane, M. Huerre, S. van der Werf & M. K. Taha, (2003) A model of meningococcal bacteremia after respiratory superinfection in influenza A virus-infected mice. *FEMS Microbiol Lett* **222**: 99-106.
- Antignac, A., J. M. Alonso & M. K. Taha, (2001a) Nonculture prediction of *Neisseria meningitidis* susceptibility to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 3625-3628.
- Antignac, A., P. Kriz, G. Tzanakaki, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2001b) Polymorphism of *Neisseria meningitidis* penA gene associated with reduced susceptibility to penicillin. *J Antimicrob Chemother* **47**: 285-296.
- Arditi, M., W. Kabat & R. Yogev, (1993) Antibiotic-induced bacterial killing stimulates tumor necrosis factor-alpha release in whole blood. *J Infect Dis* **167**: 240-244.
- Botha, P., (1988) Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in southern Africa. *Lancet* **1**: 54.
- Brenner, D. J., L. W. Mayer, G. M. Carlone, L. H. Harrison, W. F. Bibb, M. C. Brandileone, F. O. Sottnek, K. Irino, M. W. Reeves, J. M. Swenson & et al., (1988) Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of

- Haemophilus influenzae biogroup aegyptius (Haemophilus aegyptius) strains associated with Brazilian purpuric fever. *J Clin Microbiol* **26**: 1524-1534.
- Brown, D. L., D. G. Greenhalgh & G. D. Warden, (1998) Purpura fulminans: a disease best managed in a burn center. *J Burn Care Rehabil* **19**: 119-123.
- Caputo, G. L., G. Baldwin, G. Alpert, J. Parsonnet, Z. A. Gillis, G. Siber & G. Fleisher, (1992) Effect of meningococcal endotoxin in a rabbit model of shock. *Circ Shock* **36**: 104-112.
- Carlone, G. M., L. Gorelkin, L. L. Gheesling, S. K. Hoiseth, M. H. Mulks, S. P. O'Connor, R. S. Weyant, J. E. Myrick, L. W. Mayer & R. J. Arko, (1989) Potential virulence factors of Haemophilus influenzae biogroup aegyptius in Brazilian purpuric fever. The Brazilian Purpuric Fever Study Group. *Pediatr Infect Dis J* **8**: 245-247.
- Caugant, D. A., L. O. Froholm, K. Bovre, E. Holten, C. E. Frasch, L. F. Mocca, W. D. Zollinger & R. K. Selander, (1986) Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of Neisseria meningitidis causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4927-4931.
- Childers, B. J. & B. Cobanov, (2003) Acute infectious purpura fulminans: a 15-year retrospective review of 28 consecutive cases. *Am Surg* **69**: 86-90.
- Davis, J., A. L. Smith, W. R. Hughes & M. Golomb, (2001) Evolution of an autotransporter: domain shuffling and lateral transfer from pathogenic Haemophilus to Neisseria. *J Bacteriol* **183**: 4626-4635.
- Dawid, S., S. J. Barenkamp & J. W. St Geme, 3rd, (1999) Variation in expression of the Haemophilus influenzae HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1077-1082.

- de Souza, A. L., J. Sztajn bok, M. M. Salgado, C. C. Romano, M. Alkmin, A. J. Duarte & A. C. Seguro, (2007) Severe myalgia of the lower extremities as the first clinical feature of meningococcal purpura fulminans. *Am J Trop Med Hyg* **77**: 723-726.
- Deghmane, A. E., C. Veckerle, D. Giorgini, E. Hong, C. Ruckly & M. K. Taha, (2009) Differential modulation of TNF-alpha-induced apoptosis by *Neisseria meningitidis*. *PLoS Pathog* **5**: e1000405.
- Dillon, J. R., M. Pauze & K. H. Yeung, (1983) Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from the gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* **1**: 779-781.
- Dolan-Livengood, J. M., Y. K. Miller, L. E. Martin, R. Urwin & D. S. Stephens, (2003) Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* **187**: 1616-1628.
- Famularo, G., C. Pozzessere, V. Trinchieri & C. De Simone, (2000) Fulminant purpuric rash. *Eur J Emerg Med* **7**: 313-315.
- Harrison, L. H., V. Simonsen & E. A. Waldman, (2008) Emergence and disappearance of a virulent clone of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius, cause of Brazilian purpuric fever. *Clin Microbiol Rev* **21**: 594-605.
- Hoiseth, S. K., C. J. Connelly & E. R. Moxon, (1985) Genetics of spontaneous, high-frequency loss of b capsule expression in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **49**: 389-395.
- Hoiseth, S. K., E. R. Moxon & R. P. Silver, (1986) Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are part of an 18-kilobase tandem duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 1106-1110.

- Holland, J., T. R. Parsons, A. A. Hasan, S. M. Cook, P. Stevenson, E. Griffiths & P. Williams, (1996) Conservation and antigenic cross-reactivity of the transferrin-binding proteins of *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **142** (Pt 12): 3505-3513.
- Hollanda, L. M., G. C. Cury, R. F. Pereira, G. A. Ferreira, A. Sousa, E. M. Sousa & M. Lancellotti, Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnology* **9**: 28.
- Holt, L. B., (1962) The growth-factor requirements of *Haemophilus influenzae*. *J Gen Microbiol* **27**: 317-322.
- Hood, D. W., M. E. Deadman, M. P. Jennings, M. Bisercic, R. D. Fleischmann, J. C. Venter & E. R. Moxon, (1996) DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11121-11125.
- Jarosik, G. P. & E. J. Hansen, (1994) Identification of a new locus involved in expression of *Haemophilus influenzae* type b lipooligosaccharide. *Infect Immun* **62**: 4861-4867.
- Jarosik, G. P., I. Maciver & E. J. Hansen, (1995) Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* requires an intact tonB gene. *Infect Immun* **63**: 710-713.
- Jarosik, G. P., J. D. Sanders, L. D. Cope, U. Muller-Eberhard & E. J. Hansen, (1994) A functional tonB gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* **62**: 2470-2477.
- Johansson, L., A. Rytönen, P. Bergman, B. Albiger, H. Kallstrom, T. Hokfelt, B. Agerberth, R. Cattaneo & A. B. Jonsson, (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science* **301**: 373-375.

- Johansson, L., A. Rytönen, H. Wan, P. Bergman, L. Plant, B. Agerberth, T. Hokfelt & A. B. Jonsson, (2005) Human-like immune responses in CD46 transgenic mice. *J Immunol* **175**: 433-440.
- Kilian, M., C. H. Mordhorst, C. R. Dawson & H. Lautrop, (1976) The taxonomy of haemophili isolated from conjunctivae. *Acta Pathol Microbiol Scand B* **84**: 132-138.
- Kroll, J. S., J. L. Farrant, S. Tyler, M. B. Coulthart & P. R. Langford, (2002) Characterisation and genetic organisation of a 24-MDa plasmid from the Brazilian Purpuric Fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. *Plasmid* **48**: 38-48.
- Kroll, J. S., P. R. Langford, K. E. Wilks & A. D. Keil, (1995) Bacterial [Cu,Zn]-superoxide dismutase: phylogenetically distinct from the eukaryotic enzyme, and not so rare after all! *Microbiology* **141** (Pt 9): 2271-2279.
- Kroll, J. S., B. M. Loynds & E. R. Moxon, (1991) The *Haemophilus influenzae* capsulation gene cluster: a compound transposon. *Mol Microbiol* **5**: 1549-1560.
- Kroll, J. S., K. E. Wilks, J. L. Farrant & P. R. Langford, (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**: 12381-12385.
- Lancellotti, M., A. Guiyoule, C. Ruckly, E. Hong, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2006) Conserved virulence of C to B capsule switched *Neisseria meningitidis* clinical isolates belonging to ET-37/ST-11 clonal complex. *Microbes Infect* **8**: 191-196.
- Leaves, N. I., I. Dimopoulou, I. Hayes, S. Kerridge, T. Falla, O. Secka, R. A. Adegbola, M. P. Slack, T. E. Peto & D. W. Crook, (2000) Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J Antimicrob Chemother* **45**: 599-604.

- Levy-Bruhl, D., A. Perrocheau, M. Mora, M. K. Taha, S. Dromell-Chabrier, J. Beytout & I. Quatresous, (2002) Vaccination campaign following an increase in incidence of serogroup C meningococcal diseases in the department of Puy-de-Dome (France). *Euro Surveill* **7**: 74-76.
- Li, M. S., J. L. Farrant, P. R. Langford & J. S. Kroll, (2003) Identification and characterization of genomic loci unique to the Brazilian purpuric fever clonal group of *H. influenzae* biogroup *aegyptius*: functionality explored using meningococcal homology. *Mol Microbiol* **47**: 1101-1111.
- Martire-Greco, D., N. Rodriguez-Rodrigues, V. I. Landoni, B. Rearte, M. A. Isturiz & G. C. Fernandez, Interleukin-10 controls human peripheral PMN activation triggered by lipopolysaccharide. *Cytokine*.
- Masignani, V., M. Comanducci, M. M. Giuliani, S. Bambini, J. Adu-Bobie, B. Arico, B. Brunelli, A. Pieri, L. Santini, S. Savino, D. Serruto, D. Litt, S. Kroll, J. A. Welsch, D. M. Granoff, R. Rappuoli & M. Pizza, (2003) Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J Exp Med* **197**: 789-799.
- McIntyre, P., G. Wheaton, J. Erlich & D. Hansman, (1987) Brazilian purpuric fever in central Australia. *Lancet* **2**: 112.
- Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon & C. Mathieu, (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* **14**: 33-43.
- Peak, I. R., M. P. Jennings, D. W. Hood & E. R. Moxon, (1999) Tetranucleotide repeats identify novel virulence determinant homologues in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* **26**: 13-23.

- Rao, V. K., G. P. Krasan, D. R. Hendrixson, S. Dawid & J. W. St Geme, 3rd, (1999) Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 99-129.
- Rubin, L. G. & J. W. St Geme, 3rd, (1993) Role of lipooligosaccharide in virulence of the Brazilian purpuric fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* for infant rats. *Infect Immun* **61**: 650-655.
- Salit, I. E. & L. Tomalty, (1986) A neonatal mouse model of meningococcal disease. *Clin Invest Med* **9**: 119-123.
- Sanders, J. D., L. D. Cope, G. P. Jarosik, I. Maciver, J. L. Latimer, G. B. Toews & E. J. Hansen, (1993) Reconstitution of a porin-deficient mutant of *Haemophilus influenzae* type b with a porin gene from nontypeable *H. influenzae*. *Infect Immun* **61**: 3966-3975.
- Santana-Porto, E. A., A. A. Oliveira, M. R. da-Costa, A. Pinheiro, C. Oliveira, M. L. Lopes, L. E. Pereira, C. Sacchi, W. N. Araujo & J. Sobel, (2009) Suspected Brazilian purpuric fever, Brazilian Amazon region. *Emerg Infect Dis* **15**: 675-676.
- Strouts, F. R., P. Power, N. J. Croucher, N. Corton, A. van Tonder, M. A. Quail, P. R. Langford, M. J. Hudson, J. Parkhill, J. S. Kroll & S. D. Bentley, Lineage-specific virulence determinants of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. *Emerg Infect Dis* **18**: 449-457.
- Swartley, J. S., A. A. Marfin, S. Edupuganti, L. J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger & D. S. Stephens, (1997) Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 271-276.

- Taha, M. K., A. Antignac, P. Renault, A. Perrocheau, D. Levy-bruhl, P. Nicolas & J. M. Alonso, (2001) [Clonal spread of *Neisseria meningitidis* W135]. *Presse Med* **30**: 1535-1538.
- Taha, M. K., P. C. Morand, Y. Pereira, E. Eugene, D. Giorgini, M. Larribe & X. Nassif, (1998) Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol* **28**: 1153-1163.
- Thatcher, R. W., W. T. McCraney, D. S. Kellogg, Jr. & W. H. Whaley, (1969) Asymptomatic gonorrhea. *JAMA* **210**: 315-317.
- Tondella, M. L., F. D. Quinn & B. A. Perkins, (1995) Brazilian purpuric fever caused by *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* strains lacking the 3031 plasmid. *J Infect Dis* **171**: 209-212.
- Vazquez, J. A., C. Marcos, L. de la Fuente & S. Berron, (1996) [Decrease in the incidence of moderately penicillin resistant meningococci (CMI₅₀ or = 0.12 micrograms/ml). *Enferm Infecc Microbiol Clin* **14**: 273.
- Virata, M., N. E. Rosenstein, J. L. Hadler, N. L. Barrett, M. L. Tondella, L. W. Mayer, R. S. Weyant, B. Hill & B. A. Perkins, (1998) Suspected Brazilian purpuric fever in a toddler with overwhelming Epstein-Barr virus infection. *Clin Infect Dis* **27**: 1238-1240.
- Vogel, L., B. Duim, F. Geluk, P. Eijk, H. Jansen, J. Dankert & L. vanAlphen, (1996a) Immune selection for antigenic drift of major outer membrane protein P2 of *Haemophilus influenzae* during persistence in subcutaneous tissue cages in rabbits. *Infect Immun* **64**: 980-986.
- Vogel, U., S. Hammerschmidt & M. Frosch, (1996b) Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitis* serogroup B are

- prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol Immunol* **185**: 81-87.
- Webb, D. C. & A. W. Cripps, (1999a) Immunization with recombinant transferrin binding protein B enhances clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from the rat lung. *Infect Immun* **67**: 2138-2144.
- Webb, D. C. & A. W. Cripps, (1999b) A method for the purification and refolding of a recombinant form of the nontypeable *Haemophilus influenzae* P5 outer membrane protein fused to polyhistidine. *Protein Expr Purif* **15**: 1-7.
- Wharton, S. M. & C. A. Reid, (1998) Purpura fulminans localising to a recent burn injury. *Burns* **24**: 680-682.
- Wong, V. K., W. Hitchcock & W. H. Mason, (1989) Meningococcal infections in children: a review of 100 cases. *Pediatr Infect Dis J* **8**: 224-227.
- Yi, K., D. S. Stephens & I. Stojiljkovic, (2003) Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect Immun* **71**: 1849-1855.
- Zaga-Clavellina, V., G. Garcia-Lopez, H. Flores-Herrera, A. Espejel-Nunez, A. Flores-Pliego, D. Soriano-Becerril, R. Maida-Claros, H. Merchant-Larios & F. Vadillo-Ortega, (2007) In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with *Escherichia coli* in human fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol* **5**: 46.
- Zarantonelli, M. L., M. Lancellotti, A. E. Deghmane, D. Giorgini, E. Hong, C. Ruckly, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2008) Hyperinvasive genotypes of *Neisseria meningitidis* in France. *Clin Microbiol Infect* **14**: 467-472.

- Zarantonelli, M. L., M. Szatanik, D. Giorgini, E. Hong, M. Huerre, F. Guillou, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2007) Transgenic mice expressing human transferrin as a model for meningococcal infection. *Infect Immun* **75**: 5609-5614.
- Zhu, Z., D. Stevenson, T. Ritter, J. E. Schechter, A. K. Mircheff, H. R. Kaslow & M. D. Trousdale, (2002) Expression of IL-10 and TNF-inhibitor genes in lacrimal gland epithelial cells suppresses their ability to activate lymphocytes. *Cornea* **21**: 210-214.
- Zwahlen, A. & F. A. Waldvogel, (1984) Magnitude of bacteremia and complement activation during *Neisseria meningitidis* infection: study of two co-primary cases with different clinical presentations. *Eur J Clin Microbiol* **3**: 439-441.

9. APÊNDICES

9.1 ARTIGOS SUBMETIDOS

Evidences of inflammatory response of *Haemophilus influenzae* biotype *aegyptius* causing Brazilian Purpuric Fever

Gisele Cristiane Gentile Cury¹, Rafaella Fabiana Carneiro Pereira¹, Luciana Maria de Hollanda¹, Marcelo Lancellotti^{1*}.

1 – LABIOTEC – Biotechnology Laboratory

Department of Biochemistry, Institute of Biology CP6109,

State University of Campinas – UNICAMP

CP: 6109 – CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Abstract words: 133

Article words: 3355

Running Title: Hae-BPF immune response

* Corresponding author informations: Rua Monteiro Lobato s/n, Department of Biochemistry, Institute of Biology CP6109, State University of Campinas – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55 19 35 21 61 50 FAX: +55 19 35 21 6129, e-mail: mlancell@unicamp.br

Abstract

The Brazilian Purpuric Fever (BPF) is a systemic disease with many clinical features of meningococcal sepsis and is usually preceded by purulent conjunctivitis. The illness is caused by *Haemophilus influenza* biogroup *aegyptius*, which was associated exclusively with conjunctivitis. In this work construction of the *las* gene, hypothetically responsible for this virulence, were fused with *ermAM* cassette in *Neisseria meningitidis* virulent strains and had its DNA transfer to non BPF *H. influenzae* strains. The effect of the *las* transfer was capable to increase the cytokines TNF α and IL10 expression in Hec-1B cells line infected with these transformed mutants (in eight log scale of folding change RNA expression). This is the first molecular study involving the *las* transfer to search an elucidation of the pathogenic factors by horizontal intergeneric transfer from meningococci to *H. influenzae*.

Key – words: Brazilian purpuric fever, *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*, genetic transfer, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*.

* Corresponding author informations: Rua Monteiro Lobato s/n, Department of Biochemistry, Institute of Biology CP6109, State University of Campinas – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel: +55 19 35 21 61 50 FAX: +55 19 35 21 6129, e-mail: mlancell@unicamp.br

Introduction

The Brazilian Purpuric Fever (BPF) is a fulminant pediatric disease caused by *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* (Hae). BPF was first described just over a decade ago when an outbreak emerged in several locations in the Sao Paulo State, Brazil. The illness has many clinical features of meningococcal sepsis as high fever, vomiting, abdominal pain, rapid progression of petechiae and vascular collapse. These symptoms generally manifest between 7-10 days after an episode of purulent conjunctivitis (1985; 1986; 1987a; 1987b).

Major outbreaks of BPF occurred from 1984 through 1990, and sporadic cases also have been reported in Australia (McIntyre et al. 1987), USA (Virata et al. 1998) and recently in 2007 in Amazonas region, Brazil (Santana-Porto et al. 2009). However, the disease may be more common than expected. Since the clinical picture is very similar to the meningococcal septicemia, possible cases of BPF could be misreported. Currently, BPF is a disease requiring mandatory reporting in Brazil, because BPF agents may potentially lead to new outbreaks.

Before the emerging of BPF, Hae was a bacterium only associated with conjunctivitis, producing seasonal and epidemic infection in hot climates (Pittman and Davis 1950). Little is known of the determinants of Hae virulence or the pathogenesis of infection in BPF. Potential virulence factors such as pilus proteins and lipopolysaccharide have been investigated in the infant rat model (Rubin and St Geme 1993) and *in vitro* with endothelial cells (Quinn et al. 1995; Weyant et al. 1994), but these factors have not been consistently associated with the pathogenesis of BPF. The invasive unique phenotype in Hae makes evident that this bacterium has virulence factors absent in the rest of *Haemophilus* strains.

The horizontal transfer of virulence genes has a major role in the evolution of bacterial pathogens and since the natural genetic exchange between *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* was already described (Kroll et al. 1998), the highly virulent “meningococcal” phenotype in Hae may be result of the genetic transfer from the meningococcus to Hae-BPF. One possible explanation for the emergence of the invasive Hae strains is an occurrence of a genetic exchange of invasiveness genes between those two bacteria. Meningococcal conserved sequences were identified in the Hae strains associated with BPF determined as NMB0419 in *N. meningitidis* and *bfp001* in Hae (Li et al. 2003).

The *lav* gene is another proof of the lateral transfer between *Haemophilus* and *Neisseria*. This gene is predicted to encode a virulence-associated autotransporter and to be transferred from *H. influenzae* to *Neisseria*. Through homology and base sequences analysis, it was observed that a novel type of this autotransporter had emerged in Hae, which was described as *las* (Davis et al. 2001).

In the present work, we aimed to analyze the role of the *las* gene as a virulence determinant in BPF. Constructions of the *las* gene from Hae were transfer to non BPF *H. influenzae* strains and the inflammatory effects were analyzed and measured in an endothelial cellular system *in vitro*. This work is the first molecular study involving the *las* transfer to search an elucidation of the pathogenic factors by horizontal intergeneric transfer between meningococci and *H. influenzae*.

Material and Methods

Bacterial conditions

The *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* strains used in this work (Table 1) were grown in chocolate agar at 37°C with 5% CO₂. When needed, culture media were supplemented with erythromycin at 2 µg/mL for *N. meningitidis* receptor strains or 1 µg/mL for *H. influenzae* receptor strains.

DNA Techniques

Recombinant DNA protocols and transformation were performed as described previously (Hollanda et al.; Lancellotti et al. 2008). The oligonucleotides used are listed in Table 2. All the mutants obtained by homologous recombination were verified by PCR analysis using an oligonucleotide harboring the target gene and another harboring the cassette.

Construction of fusion mutation in *las::ermAM*

The *las* gene was amplified from Hae11116 strain using the template sequence from GenBank GI: 14994100. Initially, the upstream region of the start codon was amplified using the primers lasiF and lasiR (table 2). The downstream region to start codon of *las* was also amplified using lasfF and lasfR primers (Table 2). The lasi and lasf amplicons were cloned in pGEMT Easy (Promega), originating the plasmids pLAN 75 and pLAN76, respectively. Both plasmids had one *BamHI* site, which was necessary to future insertions. In the *BamHI* site of pLAN75 was inserted the *ermAM* cassette to generate the pLAN77. A new amplification reaction was performed using the ERAM3 and lasiF primers using pLAN77 as template. The amplicon obtained was inserted in *BamHI* site of pLAN76 generating the transcriptional fusion vector pLAN78. Then, this

vector was transformed in *N. meningitidis* B4 strain, originating the LG2 strain (figure 1).

Genetic transfer assays of *las* gene from *N. meningitidis* to *H. influenzae*.

The fused mutant LG2 was used as DNA donor to performed *in vitro* transformation of *H. influenzae* RdKw20 and *H. influenzae* β lac strains. The transformation process was performed according specifications already described (Taha et al. 1998) adapted for *H. influenzae* using the BHI liquid medium (supplemented with haemin and NAD at 10 μ g/mL). The *H. influenzae* strains were growth in chocolate agar and suspensions of DO 600 in supplemented BHI were made. The 5 μ g of DNA from LG2 strain was added in the bacterial suspensions and then incubated at 37°C in atmosphere of 5% of CO₂ by 5 hours. The suspensions were plated in chocolate agar with erythromycin.

Hec1b Cell Culture and Adhesion assay

Hec1B cells line were grown in plastic flasks (25 cm²) with RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP Brazil), supplemented with 2% L-glutamine, 120 μ g/mL of garamycin and 10% inactivated fetal bovine serum (complete medium). The tests for adhesion in cells followed specifications already described (Pereira RFC 2011).

Production of inflammatory cytokines by Real Time PCR

For those strains that promoted morphological alterations in Hec1b cells were performed analysis of the cytokines (IL10 and TNF α) production. Total RNA was extracted using the Trizol Reagent (Invitrogen, Calsbag, CA, USA). RNA yield was estimated by Nanodrop (Thermo Scientific). A minimum amount of 0.2 ng of the RNA was submitted to reverse transcription followed by qRT PCR. Real-time PCR primers

are listed in Table 2 and the reaction was performed using the StepONE Plus thermocycler (Applied Biosystems). Each 10 μ L reaction contained 400 nM of each primer, 5 μ L Master Mix and 1/60 000 Fast EVA Green Master Mix (both from Biotium), 0,25 μ L of Super Script III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen Calsbad, CA, USA) and the recommendations for cDNA production described in the kit were followed. Reactions were repeated on three different biological replicates using as endogenous control the GAPDH gene and fold expression changes were averaged. The data was analyzed by the comparative Ct method revised in (Schmittgen and Livak 2008).

Statistical analysis

The data from each assay were statistically analyzed using Turkey's test compared with a control sample and $P < 0.05$ was considered significant. All experiments were performed in triplicate and the data shown in the graphs and in the table represent the means $\pm$ standard errors.

Results

For the production of the *las::ermAM* gene aiming the detection of the *las* transfer was used the template strain Hae11116 (GenBank GI: 14994100). The construction of pLAN78 and the correct insertion of each construction component were verified using *ermAM*'s and *las*'s primers. This construction was used in the transformation of B4 strain for the achievement of the mutant B4 LG2.

The artificial horizontal transfer from *N. meningitidis* to *H. influenzae* strains was performed using the DNA extracted from strain LG2 and the strains Rd and β lac were used as receptors, originating the mutants Rd LG2 and β lac LG2. The transference

process was verified by erythromycin resistant transformants at 1µg/mL. Also, analyses for *las::ermAM* insertion were made using the primer *lasi* and ERAM1 (data not shown).

H. influenzae and *N. meningitidis* transformants and their wild types, three Hae-BPF strains (Hae 254/86, Hae 284/86 and Hae 258/86) and one typical *H. influenzae* (Hi 46) strain were analyzed in inducing expression of cytokines TNFα and IL10 in Hec-1-B cells. The *in vitro* assays showed that the insertion of the foreign construction in the *N. meningitidis* B4 donor strain did not influence the cytokines production when the B4 mutant LG2 infected Hec-1B cells. There was an increase in the expression of these inflammatory cytokines in Hec-1B cells when infected with the transformed strains βlac and Rd. Still, the levels of IL10 expression in the infection with the mutants were higher than in the presence of the Hae-BPF strains (figure 2).

Discussion

The use of the increase of cytokines in septic shock characterization is normally done in *N. meningitidis* pathologies. The implication of TNFα and interleukines, such as IL10, in meningococci sepsis is well described by many authors (Bjerre et al. 2004; Brandtzaeg et al. 2001; Jacobs and Tabor 1990). In this work the use the Hec-1-B cells line, which had already used as model of TNFα verification in meningococcal infection (Pereira RFC 2011; Taha 2000), for the immunological analysis in the transfer process of the *las* gene from meningococci strains to *H. influenzae* not associated with the *purpura fulminans* process. Nevertheless, the study of the immune response of *H. influenzae* biotype *aegyptius* causing the Brazilian purpuric fever had never been described before *in vitro*. The strains involved in the first BPF outbreak Hae254, Hae258 and Hae284 were able to activate the expression of IL10 and TNFα in Hec-1B

cells. Though, the expression profile was lower than that observed in the transformants (Figure 2). The differential cytokines production is an important result still in study by our group. Whereas the invasive phenotype is unique in Hae strains within the *Haemophilus* genre, the use of a transcriptions fusion, as mimicking models of bacterial genetic transfer, is a useful and neglected tool in the search of Hae's virulence factors. Nevertheless, the effect of the genetic transfer of the intergeneric of *las* gene open a new discussion about its implication in BPF physiopathology. Since the gene *las* was proved to have differences between *lav* from *H. influenzae* (Davis et al. 2001), it is possible that this gene is associated with Hae virulence. The present work do not touch the details of the ancestry of *las* gene described (Davis et al. 2001), However, the role of *las* in the transfer of pathogenic characteristics in NTHi strains was evidenced with production of IL10 and TNF α in cells infected with the β lacLG2 and RdLG2 mutants (figure 2).

Still, it is very important to reinforce that the gene acquisition was mediated by an environmental action. The BPF outbreak occurred in the Southeast Brazilian region where the primitive agriculture was performed with a great emission of carbon dust from sugar cane burn. The atmosphere is similar to the one described to *N. meningitidis* using nanostructures mimicking the action of dust and particles formed by silica and carbon in atmosphere (Hollanda et al.; Mattos et al.). Thereby, the involvement of environment mimicked through the use of nanoparticles is one of the focus in our group research.

Recently the whole genome of Hae254/86 (also described as F3031) was sequenced and deposited in GenBank (accession no. FQ670178). The genomes of 254/86, F3047 a nontybeable *H. influenzae* that causes otitis and other five *H. influenzae* strains also non-invasive were compared. It was observed that more than 75 % of the Hae 254/86

genome is similar among this *H. influenzae* strains (Strouts et al.). The genome of the strain Hae 258/86 was sequenced as well as it's assembling and annotation is in process currently by our research group. Despite the fact that 254/86, 258/86 and all the other strains isolated from the Brazilian outbreak belong to the same clonal group (Brenner et al. 1988), the strains are genetically distinct and the complete genome sequence of more than one strain of this clone will be a very helpful tool to better define the virulence determinants in the unique BPF clinical picture.

Also, new strategies to study this interesting bacterium must be considered and the search for new virulence variants. The emergence of a new outbreak in Brazil (Santana-Porto et al. 2009) might be an indicative of omitted cases, reinforcing the importance of new studies about its pathogenicity and prophylaxis.

In conclusion, the *las* gene could be a possible predominant virulence gene involved in the pathology caused by *H. influenzae* biogroup *aegyptius* – BPF. This is the first molecular study involving the *las* transfer to search an elucidation of the pathogenic factors by horizontal intergeneric transfer from meningococci to *H. influenzae*. Also, the effect of the *las* transfer was capable to increase the cytokines TNF α and IL10 expression in Hec-1B cells line infected with these transformed mutants. These results reinforced the hypothesis of the real involving of *las* gene in *H. influenzae* biotype *aegyptius* causing the brazilian purpuric fever.

Acknowledgements

All the authors declare have no conflicts of interest in this work. This work was supported by FAPESP (number 2008/56777-5) and CNPq (number 575313/2008-0). Thanks for the English revision for Julia N. Varela.

Legend of Figures

Figure 1: The gene *las* was amplified from Hae11116 strain using the template sequence from GeneBank GI: 14994100. Initially, the upstream region of start codon of *las* gene was amplified using the primers lasiF and lasiR (table 2). Also the downstream region of *las* was amplified with the primers lasfF and lasfR. Both amplicons were cloned in pGEMT Easy (Promega), originating pLAN 75 and pLAN76. In *Bam*HI site of pLAN75, was inserted the *ermAM* cassette to generate the pLAN77. A new amplification reaction was performed using the ERAM3 and lasiF primers with the pLAN77 as template. The amplicon obtained was inserted in *Bam*HI site of pLAN76 generating the transcriptional fusion vector pLAN78. This vector was then transformed in B4 *N. meningitidis* strain, originating the LG2 strain.

Figure 2: Expression of tumor necrose factor alpha – TNF α (white bars) and interleukin 10 – IL10 (gray bars). The Y axis shows the log folding change of RNA expression. The mutants RdLG2 and β lac LG2 demonstrated significant increase of TNF α and IL10 expression when compared with receptor strains Rd and β lac LG2 (black arrows). P>0,05.

References

1985. Preliminary report: epidemic fatal purpuric fever among children--Brazil. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **34**(16): 217-219.
1986. Brazilian purpuric fever: Haemophilus aegyptius bacteremia complicating purulent conjunctivitis. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **35**(35): 553-554.
- 1987a. Haemophilus aegyptius bacteraemia in Brazilian purpuric fever. Brazilian Purpuric Fever Study Group. Lancet, **2**(8562): 761-763.
- 1987b. Brazilian purpuric fever: epidemic purpura fulminans associated with antecedent purulent conjunctivitis. Brazilian Purpuric Fever Study Group. Lancet, **2**(8562): 757-761.

- Bjerre, A., Brusletto, B., Hoiby, E.A., Kierulf, P., and Brandtzaeg, P. 2004. Plasma interferon-gamma and interleukin-10 concentrations in systemic meningococcal disease compared with severe systemic Gram-positive septic shock. *Crit Care Med*, **32**(2): 433-438.
- Brandtzaeg, P., Bjerre, A., Ovstebo, R., Brusletto, B., Joo, G.B., and Kierulf, P. 2001. *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res*, **7**(6): 401-420.
- Brenner, D.J., Mayer, L.W., Carlone, G.M., Harrison, L.H., Bibb, W.F., Brandileone, M.C., Sottnek, F.O., Irino, K., Reeves, M.W., Swenson, J.M., and et al. 1988. Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian purpuric fever. *J Clin Microbiol*, **26**(8): 1524-1534.
- Davis, J., Smith, A.L., Hughes, W.R., and Golomb, M. 2001. Evolution of an autotransporter: domain shuffling and lateral transfer from pathogenic *Haemophilus* to *Neisseria*. *J Bacteriol*, **183**(15): 4626-4635.
- Hollanda, L.M., Cury, G.C., Pereira, R.F., Ferreira, G.A., Sousa, A., Sousa, E.M., and Lancellotti, M. Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnology*, **9**: 28.
- Hollanda, L.M., Cury, G.C., Pereira, R.F., Ferreira, G.A., Sousa, A., Sousa, E.M., and Lancellotti, M. Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnology*, **9**(1): 28.
- Jacobs, R.F., and Tabor, D.R. 1990. The immunology of sepsis and meningitis--cytokine biology. *Scand J Infect Dis Suppl*, **73**: 7-15.

- Kroll, J.S., Wilks, K.E., Farrant, J.L., and Langford, P.R. 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): 12381-12385.
- Lancellotti, M., Pace, F., Stehling, E.G., Villares, M.C., Brocchi, M., and Silveira, W.D. 2008. Ribotyping, biotyping and capsular typing of *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients in Campinas, southeast Brazil. *Braz J Infect Dis*, **12**(5): 430-437.
- Li, M.S., Farrant, J.L., Langford, P.R., and Kroll, J.S. 2003. Identification and characterization of genomic loci unique to the Brazilian purpuric fever clonal group of *H. influenzae* biogroup *aegyptius*: functionality explored using meningococcal homology. *Mol Microbiol*, **47**(4): 1101-1111.
- Mattos, I.B., Alves, D.A., Hollanda, L.M., Ceragiogli, H.J., Baranauskas, V., and Lancellotti, M. Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process. *J Nanobiotechnology*, **9**: 53.
- McIntyre, P., Wheaton, G., Erlich, J., and Hansman, D. 1987. Brazilian purpuric fever in central Australia. *Lancet*, **2**(8550): 112.
- Overbergh, L., Kyama, C.M., Valckx, D., Debrock, S., Mwenda, J.M., Mathieu, C., and D'Hooghe, T. 2005. Validation of real-time RT-PCR assays for mRNA quantification in baboons. *Cytokine*, **31**(6): 454-458.
- Pereira RFC, A.D., Jacinto RK, Hollanda LM, Verinaud LMC, Machado CML and Lancellotti M 2011. Effects of *Neisseria meningitidis* Infection in Tumor Glioblastoma Cell Line NG97: Respiratory Pathogen Inducing Apoptosis. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, **2**(4): 5.

- Pittman, M., and Davis, D.J. 1950. Identification of the Koch-Weeks bacillus (*Hemophilus aegyptius*). *J Bacteriol*, **59**(3): 413-426.
- Quinn, F.D., Weyant, R.S., Worley, M.J., White, E.H., Utt, E.A., and Ades, E.A. 1995. Human microvascular endothelial tissue culture cell model for studying pathogenesis of Brazilian purpuric fever. *Infect Immun*, **63**(6): 2317-2322.
- Rubin, L.G., and St Geme, J.W., 3rd 1993. Role of lipooligosaccharide in virulence of the Brazilian purpuric fever clone of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* for infant rats. *Infect Immun*, **61**(2): 650-655.
- Santana-Porto, E.A., Oliveira, A.A., da-Costa, M.R., Pinheiro, A., Oliveira, C., Lopes, M.L., Pereira, L.E., Sacchi, C., Araujo, W.N., and Sobel, J. 2009. Suspected Brazilian purpuric fever, Brazilian Amazon region. *Emerg Infect Dis*, **15**(4): 675-676.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, **3**(6): 1101-1108.
- Strouts, F.R., Power, P., Croucher, N.J., Corton, N., van Tonder, A., Quail, M.A., Langford, P.R., Hudson, M.J., Parkhill, J., Kroll, J.S., and Bentley, S.D. Lineage-specific virulence determinants of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. *Emerg Infect Dis*, **18**(3): 449-457.
- Taha, M.K. 2000. *Neisseria meningitidis* induces the expression of the TNF-alpha gene in endothelial cells. *Cytokine*, **12**(1): 21-25.
- Taha, M.K., Morand, P.C., Pereira, Y., Eugene, E., Giorgini, D., Larribe, M., and Nassif, X. 1998. Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol*, **28**(6): 1153-1163.

- Virata, M., Rosenstein, N.E., Hadler, J.L., Barrett, N.L., Tondella, M.L., Mayer, L.W., Weyant, R.S., Hill, B., and Perkins, B.A. 1998. Suspected Brazilian purpuric fever in a toddler with overwhelming Epstein-Barr virus infection. Clin Infect Dis, **27**(5): 1238-1240.
- Weyant, R.S., Quinn, F.D., Utt, E.A., Worley, M., George, V.G., Candal, F.J., and Ades, E.W. 1994. Human microvascular endothelial cell toxicity caused by Brazilian purpuric fever-associated strains of *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*. J Infect Dis, **169**(2): 430-433.