FABIANA MAHYLOWSKI RINALDI

Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2014

FABIANA MAHYLOWSKI RINALDI

Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elizabeth N. De Gaspari

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rinaldi, Fabiana Mahylowski.
Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF) / Fabiana Mahylowski Rinaldi. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Natal de Gaspari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Adjuvantes para vacinas (nanotecnologia).

Versão do título para o inglês: Immunogenicity of *Neisseria meningitidis* B outer membrane vesicles (OMVs) associated with cationic lipid (DDA-BF).

1. *Neisseria meningitidis* B 2. Vesículas de membrana externa 3. DDA-BF 4. Adjuvante 5. Vacinas meningocócicas 6. Avidez I. Gaspari, Profa. Dra. Elizabeth Natal de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB039/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Fabiana Mahylowski Rinaldi.

Título da Dissertação: Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF).

Orientador(a): Profa. Dra. Elizabeth Natal de Gaspari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Parecer da comissão de ética CTC

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL

Projeto CTC nº 41D-2011 (Protocolo 134032/2011)
Estudo da imunogenicidade de antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* e interação com lípides catiônicos. Coordenação: **Dra. Elizabeth Natal de Gaspari**

Senhor Coordenador,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pelo CEUA-IAL/Pasteur.

Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 18 de maio de 2012

1ª via: CTC/IAL
2ª via: Coordenador

À minha mãe, ao meu esposo e a minha amada filha, pelo apoio e dedicação, pelo carinho e paciência.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao laboratório de anticorpos monoclonais, antígenos e adjuvantes no Instituto Adolfo Lutz, onde desenvolvi minha dissertação, à minha incrível orientadora, Elizabeth Natal De Gaspari, aos colegas de trabalho e de rotina do dia-a-dia, do Centro de Imunologia. Também estendo meus agradecimentos aos colaboradores deste projeto, Emanuelle Baldo Gaspar e Nilton Lincopan, por estarem presentes em todo o processo da realização deste.

Ao meu marido, Rubens Rinaldi Neto, pelo apoio e por cada impulso positivo nesta fase de estudos e desenvolvimento do projeto, por estar ao meu lado e me ajudar a construir minha carreira, com paciência e dedicação.

À minha mãe, que nunca deixou com que o desânimo fizesse parte de minha vida, e aos meus familiares que se alegraram com mais um passo em minha carreira. Aos colegas Emerson Nogueira, do Núcleo de Patologia do IAL, que sempre esteve disposto a se engajar em nossos projetos.

À Universidade de São Paulo, pelo suporte teórico, e ao Programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia, pelo grande apoio e realização.

Este Trabalho foi realizado no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz

Apoio Financeiro FAPESP 12/15568-0

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”
Albert Einstein

RESUMO

RINALDI, F. M. **Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF).** 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Neisseria meningitidis é um diplococo Gram–negativo, aeróbio e encapsulado, causador mais comum de meningite e septicemia. Este agente é o principal causador de infecções bacterianas invasivas no mundo. Apesar de existirem 13 sorogrupos de *N. meningitidis*, apenas 6 são capazes de causar infecção: A, B, C, W135, X e Y. O sorogrupo B difere dos outros sorogrupos patogênicos por sua cápsula polissacáride ter composição idêntica ao ácido policiálico, presente em muitas glicoproteínas humanas, particularmente encontrados no tecido cerebral fetal, e bioquimicamente homóloga com a estrutura molecular de adesão do neurônio. Sendo assim, a cápsula polissacáride não pode ser usada em vacinas conjugadas, pois pode causar autoimunidade, sendo pouco imunogênica. Doenças meningocócicas causadas pelos sorogrupos A, C, Y e W135 podem ser prevenidas pelas vacinas que contêm polissacarídeos capsulares específicos conjugados. Para que uma vacina seja eficaz contra o sorogrupo B, é importante que esta abranja todos os sorotipos e seja capaz de promover imunidade duradoura, principalmente em crianças abaixo de dois anos, as mais acometidas. Vacinas baseadas em vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer Membrane Vesicles*) de *N. meningitidis* B são amplamente estudadas. No presente estudo, OMVs de meningococo B (B:4:P1.9) foram associadas a um lipídio catiônico, o dioctadecildimetilamônio (DDA-BF) em preparação antigênica testada em camundongos fêmeas não isogênicos, e comparamos os títulos de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b com os anticorpos produzidos por camundongos imunizados com a mesma OMVS associada ao hidróxido de alumínio, por ELISA. As análises foram realizadas com soros de cada animal colhidos individualmente, após 60 dias de imunização. A avidez dos anticorpos também foi analisada por ELISA. *Immunoblot* e Dot-ELISA avaliaram a reação específica entre a cepa homóloga usada na imunização e a reação a antígenos cruzados com outras cepas de meningococo. A hipersensibilidade tardia (HTT) foi comparada entre os dois grupos experimentais, após o desafio com cepa homóloga em uma das patas, depois de 24 horas da injeção, após 14 dias da primeira dose de imunização.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis* B. Vesículas de membrana externa. DDA-BF. Adjuvante. Vacinas meningocócicas. Avidez.

ABSTRACT

RINALDI, F. M. **Immunogenicity of *Neisseria meningitidis* B outer membrane vesicles (OMVs) associated with cationic lipid (DDA-BF).** 2014. 119 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Neisseria meningitidis is an encapsulated Gram-negative aerobic diplococcus, the most commom meningitidis and sepsis agent , and the major bacterial invasive disease agent worldwide. Infections are caused by only 6 of 13 pathogenic serogroups: A,B,C, W135 and Y. Meningococcal serogroup B differs from the other pathogenic serogroups because it has a capsular polysaccharide identical to the polysialic acid present in many human glycoproteins, in particular, it is similar to carbohydrates found in fetal brain tissue. This is the reason that it does not allow the use of polysaccharide protein in conjugate vaccine, and for its low immunogenic. An effective meningococcal B vaccine development should cover all serotypes and be able to promote long term immunity, mainly in children under 2 years, the most affected age. Meningococcal outer membrane vesicles (OMVs) vaccines are widely studied. In this present study, meningococcal serogroup B OMVs (B:4:P1.9) was associated with a cationic lipid, dioctadecyldimetylammonium (DDA-BF) in an antigenic preparation tested in female outbred mice. Individual serum was collected, and antibodies titles IgG, IgG1, IgG2a were compared with animals immunized with OMVs and aluminium hydroxide, analyzed by ELISA. Analyses were carried out 60 days after first immunization. Antibodies avidity index were also analyzed by ELISA. Immunoblot and Dot-ELISA were carried out to evaluate specific reaction for homologous stranis and cross-reactive antigens present in other meningococcal strains. Delayed type hypersensitivity (DTH) was compared between two experimental groups, 24 hours before injection of homologous strain challenge.

Keywords: *Neisseria meningitidis* B. Outer membrane vesicles. DDA-BF. Adjuvant. Meningococcal. Avidity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – **Proteínas de membrana externa de *N. meningitidis***.....24

Figura 2 – Distribuição percentual por sorogrupo da doença meningocócica no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2012. 27

Figura 3 – **Incidência e letalidade da doença meningocócica no estado de São Paulo, de 1998 a 2012.**.....29

Figura 4 – Incidência da doença meningocócica por faixa etária, no estado de São Paulo, de 1998 a 2012. 31

Figura 5 – **Microscopia eletrônica de vesículas de mambrana externa (OMVs) de meningococo.**.....41

Figura 6 – Esquema da formação dos fragmentos de bicamada (BF) de DDA, e os complexos DDA-BF/antígeno......52

Figura 7 – Perfil eletroforético das OMVs de *N. meningitidis* e *N. lactamica* por SDS-Page. 69

Figura 8 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG produzidos no soro de camundongos imunizados após uma dose. 71

Figura 9 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG produzidos no soro de camundongos imunizados após 2 doses......72

Figura 10 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG1 presentes no soro de camundongos imunizados após duas doses. 74

Figura 11 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG2a presentes nos soros de camundongos imunizados após duas doses. 75

Figura 12 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG2b presentes nos soros de camundongos imunizados após duas doses. 76

Figura 13 – Porcentagem de inchaço das patas dos animais desafiados com 2 µg de OMVs de *N. meningitidis* após 24 horas do desafio. 77

Figura 14 – ***Immunoblot* para análise da reatividade específica da cepa homóloga de *N. meningitidis* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam uma dose de imunização.**.....79

Figura 15 – *Immunoblot* para análise da reatividade específica da cepa homóloga de *N. meningitidis* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam duas doses de imunização. 81

Figura 16 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa heteróloga de *N. meningitidis* (B:4:P1.15) pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam uma dose de imunização, revelados por Ponceau......82

Figura 17 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa heteróloga de *N. meningitidis* (B:4:P1.15) pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam duas doses de imunização. 84

Figura 18 - *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa comensal *N. lactamica* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam uma dose de imunização, revelados por Ponceau......85

Figura 19 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa de *N. lactamica* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam duas doses de imunização......86

Figura 20 – Avaliação das cepas isoladas de pacientes com DM nos anos 2011-2012 pelos anticorpos IgG presentes no soro de camundongos imunizados“pool” com DDA-BF/OMVs, após duas doses de imunização......87

Figura 21 – Avaliação das cepas isoladas de pacientes com DM nos anos 2011-2012 pelos anticorpos IgG presentes no soro de camundongos imunizados “pool” com H.A./OMVs, após duas doses de imunização......88

Figura 22 – Avaliação das cepas isoladas de pacientes com DM nos anos 2011-2012 com soro normal “*pool*” de camundongos dos grupos controle......89

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Doença meningocócica: casos e porcentagens por sorogrupo no estado de São Paulo, de 1998 a 2013.....28

Tabela 1 - Histórico de vacinas meningocócicas ao longo dos anos.....37

Tabela 2 – Vacinas desenvolvidas contra o sorogrupo B de *N. meningitidis*.....39-40

Tabela 3 - Esquema de imunização dos animais com OMVs de *N. meningitidis* complexados ao DDA-BF ou hidróxido de alumínio.....62

Quadro 2 - Avaliação dos Índices de Avidez para anticorpos IgG presentes no soro de acordo com Chackerian et al., 2001.....66

Tabela 4 - Esquema utilizado para imunização e coleta de sangue dos animais, assim como avaliação do HTT.....70

Tabela 5 – Índice de avidez (IA) dos anticorpos IgG presentes no soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, após duas doses recebidas.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEC: 3-amino-9-ethylcarbazole

Al (OH)3: hidróxido de alumínio

AMB: anfotericina B

APC: célula apresentadora de antígeno

ASO4, ASO2, ASO1 e ASO15: sistemas de adjuvantes da GSK

BHI: *"Brain Heart Infusion Agar"*

C.V.E.: Centro de Vigilância Epidemiológica

CD4: receptor para MHC de classe II

CD46: proteína regulatória do complemento

CD8: receptor para MHC de classe I

CO2: dióxido de carbono

CRIE: Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais

CTL: citotoxidade celular

DC: células dendríticas

DDA: dioctadecildimetilamonium

DDA-BF: fragmento de bicamada de dioctadecildimetilamonium

DM: doença meningocócica

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: *"Enzyme Linked Immunosorbent assay"*

EUA: Estados Unidos da América

Fbp: *"Ferric Binding Protein"*

FHBP: "*Factor H binding protein* "

FRP: *"Iron Restriction Protein"*

g: gramas, quando referente ao peso de soluções e reagentes

GNA2132 *"genomic derived Neisseria antigens*"

GSK: Glaxo Smith Kline®

H.A.: hidróxido de alumínio

HTT: resposta de hipersensibilidade tardia

HV1 e HV2: regiões hipervariáveis nas sequências de aminoácidos

IA: índice de avidez de um anticorpo

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ICOMS: complexos imuno-estimulatórios

IFN: interferon

IgG: imunoglobulina de isótipo G

IgG1, IgG2a, IgG2b: subclasses de imunoglobulina de isótipo G

IgM: imunoglobulina de isótipo M

IL: interleucina

IROMPS: *"Iron Regulated Proteins"*

ISOCOMATRIX: adjuvante similar aos ICOMS

kDa: Kilodalton

KSCN: tiocianato de potássio

Lbp: *"Lactoferrin Binding protein"*

LOS: lipooligossacáride

LPS: lipopolissacáride

M: molar

MC58: tipo de cepa de *N. meningitidis*

MF59: monofosforil 59

µg: microgramas

µL: microlitro

mg: miligramas

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

mL: mililitro

mM: milimolar

MPL: Monofosforil Lípide A

NaCl: cloreto de sódio

NadA: proteína oligomérica de superfície de *N. meningitidis*

NCAM: molécula de adesão neuronal

NhbA: *"neisseria heparin- binding antigen "*

nm: nanômetro

NOMVS: *"Natival Outer Membrane Vesicle"*

NspA: *"Neisserial surface protein A"*

OMP: *"Outer Membrane Proteins"*

OMVS: *"Outer Membrane Vesicles"*

Opa: *"Opacity Associated Protein"*

Opc: *"Outer Membrane Protein class 5C"*

P.M.: peso molecular

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: solução tamponada salina fosfatada

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: inibidor de protease

por A: gene para porina A

PorA: porina A

PorB: porina B

QS21: fração purificada de Quil A

Quil A: saponin- based adjuvant

Rmp: *"Reduction-modifiable protein"*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese me gel de poliacrilamida

SES-SP: Secretaria do estado da Saúde de São Paulo

SRBC: *"Sheep Red Blood Cells"*

SV: regiões semi - variáveis nas sequências de aminoácidos

Tbp: *"Transferrin Binding Protein"*

TCD4: receptor de linfócitos T

TCD8: receptor de linfócitos T

Th1/Th2: linfócito T-helper 1 ou 2, determinados por citocinas

TLR: *"Toll-Like Receptors"*

TMB: tetrametilbenzidina

Tris: (hidroximetil) aminometano

TSA: ágar soja e tripcaseína

TSB: caldo triptona

V: Volts

VR1, VR2, VR3 e VR4: regiões variáveis nas sequências de aminoácidos

WHO: *“World Health Organization”*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 22
1.1 Gênero *Neisseria meningitidis*..... 22
1.2 Doença meningocócica (DM).....25
1.3 Epidemiologia da doença meningocócica (DM) no Brasil e no mundo..... 27
1.4 Fatores de virulência e mecanismos de escape de *Neisseria meningitidis*.....31
1.5 Mecanismos da resposta imune durante a colonização por *Neisseria meningitidis*.....32
1.6 Vacinas meningocócicas.....35
1.7 Vacinas meningocócicas para o sorogrupo B testadas/em desenvolvimento.....37
1.7.1 Vacinologia reversa no desenvolvimento de vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B.....40
1.8 Vacinas baseadas em vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B.....42
1.9 Avidez dos anticorpos produzidos na imunização.....44
1.10 Adjuvantes.....45
1.11 Hidróxido de alumínio como adjuvante.....45
1.12 Emulsões.....46
1.13 Lipossomas como adjuvantes.....47
1.14 Virossomas.....47
1.15 Novos adjuvantes.....48
1.16 Brometo de dioctadecildimetilamonium (DDA).....50
2 OBJETIVOS.....55
2.1 Objetivo geral.....56
2.2 Objetivo específico.....56
3 MATERIAL E MÉTODOS.....57
3.1 Cepas de bactérias.....57
3.2 Obtenção das vesículas de membrana externa (OMVs) de *N. meningitidis*.....57

3.3 Dosagem de proteínas das vesículas de membrana externa de *N. meningitidis*.....58
3.4 Caracterização de antígenos de *N. meningitidis* por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....58
3.5 Coloração por azul de *Coomassie*.....59
3.6 Preparação dos lípides catiônicos DDA-BF.....59
3.7 Preparação dos complexos antigênicos DDA-BF/OMVs e hidróxido de alumínio/OMVs.....60
3.7.1 Preparação das dispersões lipídicas.....60
3.7.2 Preparação do complexo DDA-BF/OMVs.....60
3.7.3 Determinação do diâmetro médio (Dz), distribuição de tamanhos, polidispersidade, e potencial zeta (ζ) nos fragmentos de bicamada e da sua associação com OMVS de Neisseria meningitidis 60
3.7.4 Preparo dos complexos DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs 61
3.8 Animais usados no estudo.....61
3.9 Desenho experimental.....61
3.10 Esquema utilizado na imunização, coleta e desafio dos camundongos.....62
3.11 Avaliação da reatividade cruzada e específica dos anticorpos IgG produzidos nas imunizações por *Immunoblot*.....63
3.12 ELISA para avaliação de anticorpos IgG nos soros colhidos individualmente, após uma e duas doses de imunização.....64
3.13 ELISA para determinação do índice de avidez dos anticorpos após duas doses de imunização.....65
3.14 ELISA para avaliação de isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b após duas doses de imunização.....66
3.15 Avaliação da Hipersensibilidade Tardia (HTT) após uma dose de imunização.....66
3.16 Avaliação a antígenos de reatividade cruzada com cepas meningocócicas isoladas de pacientes nos anos de 2011/2012 através de Dot – ELISA.....67
3.17 Análise estatística.....67
4 RESULTADOS.....68

4.1 Caracterização dos antígenos de *N. meningitidis* por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e corados por azul de *Coomassie*.....68
4.2 Tabela de imunização dos camundongos.....69
4.3 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presente nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas (após 15 dias de imunização), por ELISA.....70
4.4 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA.....71
4.5 Determinação do índice de avidez (IA) dos anticorpos produzidos após duas doses de imunização.....72
4.6 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG1 presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA.....73
4.7 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG2a presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA.....74
4.8 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG2b presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA.....75
4.9 Avaliação da hipersensibilidade tardia (HTT) nos camundongos após a primeira dose de imunização.....76
4.10. Reatividade específica de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas, por *immunoblot*, para a cepa homóloga 78
4.11 Reatividade específica de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas, por *immunoblot*, para a cepa homóloga. 79
4.12 Reatividade a antígenos de reatividade cruzada de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot*, para a cepa heteróloga B:4.P1.15......81

4.13 Reatividade a antígenos cruzados de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot*, para a cepa heteróloga B:4.P1.15......83
4.14 Reatividade a antígenos de reatividade cruzada de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot*, para *N. lactamica*......84
4.15 Reatividade a antígenos de reatividade cruzada de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com duas dose das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot* para *N. lactamica*......85
4.16 Reatividade de anticorpos IgG do soro dos camundongos após duas doses de imunização, com cepas meningocócicas isoladas de pacientes que apresentaram DM nos anos de 2011/2012, por Dot-ELISA......87
5 DISCUSSÃO.....90
6 CONCLUSÃO.....101
REFERÊNCIAS 103
APÊNDICE - Relação de cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de pacientes, utilizadas na técnica de Dot-ELISA.....119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis é um diplococo, aeróbio e encapsulado, causador mais comum de meningite e septicemia, podendo também incluir pneumonia, artrite séptica, pericardite, conjuntivite e uretrite (ROSENSTEIN et al., 2001). É a principal causa de infecções bacterianas invasivas no mundo (MOORE, 1992).

Por ser um microrganismo Gram-negativo, a bactéria contêm duas membranas – interna ou citoplasmática e externa, separadas por uma camada de peptidoglicano, conferindo rigidez à parede celular, determinando a forma da bactéria e protegendo-a da lise osmótica. Na membrana externa existem os lipopolissacarídeos (LPS), que são endotoxinas, e também diversas proteínas (OMPs, do inglês *Outer Membrane Proteins*) que estão envolvidas na patogênese das doenças meningocócicas (DM). Ainda na membrana externa, o meningococo conta com o revestimento por uma cápsula polissacarídica que é essencial para a patogenicidade, conferindo resistência contra a fagocitose e lise mediada pelo complemento (MORLEY et al., 2002).

De acordo com sua cápsula polissacarídica; principal antígeno deste microorganismo; o meningococo é classificado em 13 sorogrupos, porém, a maior parte das infecções são causadas por apenas seis destes: A, B, C, W135, X e Y (BOISIER et al., 2007).

A identificação descritiva de uma cepa de meningococo se faz pela sequência – sorogrupo:sorotipo:subtipo. O que define o sorogrupo é o polissacarídeo capsular, tendo-os como importantes na toxicidade e poder imunogênico destes microorganismos (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985). As cápsulas dos sorogrupos A e X são compostas de N-acetil-D-Manosamina-6-fosfato e N-acetilglucosamina 1-fosfato (DOLAN-LIVENGOOD, 2003). Os sorogrupos B, C, W135 e Y possuem cápsulas compostas de ácido siálico. Os meningococos possuem a capacidade de mudar o genótipo capsular por recombinação genética (HARRISON, 2006). Porém, o sorogrupo B difere dos outros sorogrupos patogênicos por conter uma cápsula polissacáride de composição idêntica ao ácido policiálico (alfa[2-8] ácido N-acetil - neuramínico)

presente em muitas glicoproteínas humanas, particularmente encontrada no tecido cerebral fetal. Também tem estrutura homóloga à molécula de adesão do neurônio, causando autoimunidade se usada como antígeno vacinal, além de ser pouco imunogênica (HAYRIEN et al., 1995).

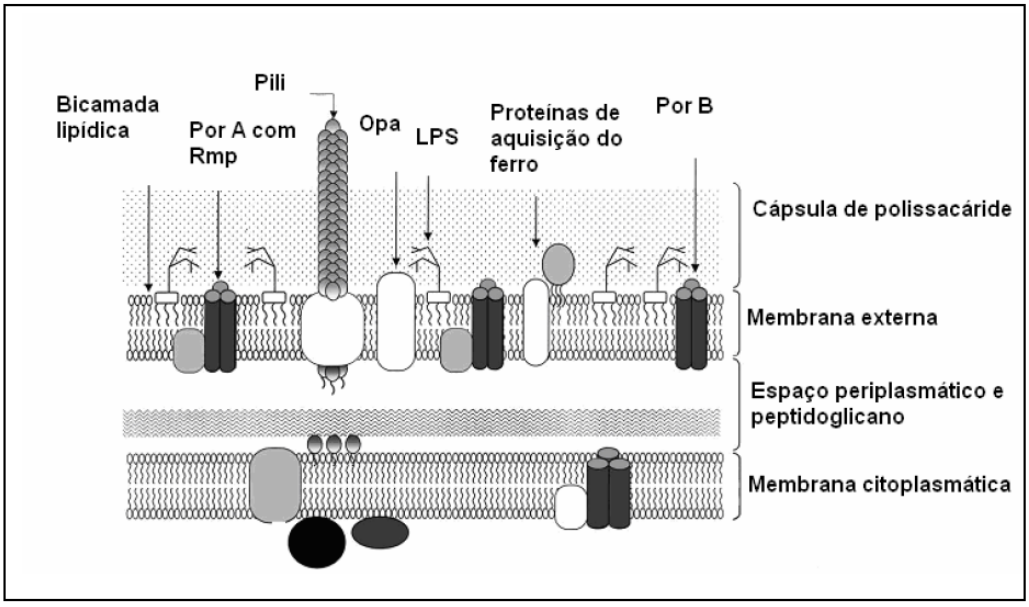
A membrana externa contém entre 3 e 5 proteínas majoritárias subdivididas em 5 diferentes classes estruturais, que aparentemente estão relacionadas com seus pesos moleculares e designam-se de classes 1, 2, 3, 4 e 5. Seus pesos moleculares seriam: classe 1 (43 – 47 kDa), classe 2/3 (37 – 42 kDa), classe 4 (33-34 kDa), classe 5 (26- 30 kDa). Todas as cepas expressam proteína de classe 2 ou 3, mas nunca ambas simultaneamente. As proteínas de classe 1 e 5 podem ser encontradas na maioria dos meningococos, mas podem variar qualitativa e quantitativamente na sua expressão. As proteínas de classe 1 ou também designadas de Porina A (PorA), são porinas que modulam a troca de íons entre o meio e a bactéria e são utilizadas na definação de subtipo (POLLARD; FRASCH, 2001). Esta proteína possui duas regiões variáveis no DNA (MCGUINNESS; LAMBDE; HECKELS, 1993), sendo que um único aminoácido mutante no gene *porA* pode aumentar a incidência de DM (MACGUINNESS et al., 1991). A deleção deste gene em algunas cepas pode fazer com que estas mudem sua estrutura, fazendo com sejam novas causadoras da DM invasiva (VAN DER ENDE; HOPMAN; DANKERT, 2000).

As proteínas de classe 2 ou 3 (PorB) são empregadas na definição dos sorotipos, também são porinas em forma de trímeros, se assemelham estruturalmente às PorA, e possuem regiões altamente variáveis nas sequências de aminoácidos (VR1, VR2, VR3 e VR4). A maior diferença está em que, enquanto as PorA são cátion-seletivas, as PorB são ânion-seletivas (POLLARD; FRASCH, 2001).

Os imunotipos são determinados pelo sorotipo lipooligossacáride, dos quais são 13, e não são usados frequentemente para a caracterização molecular de *N. meningitidis*. As cepas meningocócicas geralmente tem 2 determinantes de lipooligossacáride, enquanto que em outras cepas encontramos múltiplos determinantes (FRASCH, 1987). Mais recentemente, a carcterização de outros genes

meningocócicos de proteínas de membrana externa, como NadA, fHBP, e GNA2132 tem recebido maior atenção por fazer parte de antígenos promissores para uma vacina para o sorogrupo B (GUIULIANI et al., 2006). Como esquematizado na figura 1 a seguir, a estrutura do meningococo nos apresenta, que abaixo da cápsula polissacarídica dos meningococos encontra-se uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS, endotoxina) também conhecido como lipooligossacarídeo (LOS), e uma variedade de OMPs das quais distinguem as diferentes cepas (sorotipos e sorosubtipos) dependendo da estrutura antigênica das principais porinas (PorA e PorB). (POLLARD; FRASCH, 2001).

Figura 1 – Proteínas de membrana externa de *N. meningitidis*



Fonte: Morley e Pollard, 2002.

1.2 Doença meningocócica (DM)

A meningite é uma doença de evolução rápida e com alta letalidade, que pode variar de 7 a 70%, acometendo geralmente crianças e adultos jovens, atingindo também as outras faixas etárias (CASTIÑEIRAS; PEDRO; MARTINS, 2007). Cerca de 10% dos adolescentes e adultos são portadores assintomáticos/sadios de *N. meningitidis* na orofaringe e, assim, podem transmitir a bactéria por secreções respiratórias como saliva, espirro e tosse. Após a fase inicial de infecção o meningococo permanece na orofaringe do receptor por um curto período de tempo e acaba sendo eliminado pelos mecanismos naturais de defesa, ou, a condição do portador pode se estender por longos períodos que variam de meses até anos (BRICKS, 2002).

Os mecanismos que produzem a sepsis e a meningite meningocócica envolvem: a penetração da bactéria no trato respiratório superior, danos às células endoteliais, invasão da barreira hemato-encefálica, atingindo o sistema nervoso central e iniciando a cascata inflamatória (BRANDTZAEG, 1992). A adesão da bactéria em células mucosas pode iniciar o processo de endocitose direta, da qual os microrganismos são internalizados pelas células epiteliais não-ciliadas, frequentemente em vesículas, de onde passam a ser transportados até a membrana mucosa (STEPHENS; FARLEY, 1991). A doença invasiva ocorre, principalmente, quando as pessoas residem em moradias populosas, como conglomerados urbanos, onde entram em contato com novas cepas para as quais ainda não possuíam uma resposta imune prévia.

A infecção meningocócica pode ser restrita somente à nasofaringe, apresentando sintomas locais ou ser assintomática, ou pode ocorrer a septicemia grave, com manifestações clínicas mais graves. A doença pode ser caracterizada por início súbito, apresentando sinais clínicos como calafrios, náuses, febre alta, vômitos, dores pelo corpo, prostração e mal-estar. Evolui para a meningococcemia, caracterizada por púrpura hemorrágica e exantema patequial. O último estágio da doença é caracterizado pela síndrome de Waterhouse-Friederickson e falência múltipla dos órgãos (ROSENSTEIN et al., 2001). Uma alta concentração de endotoxina

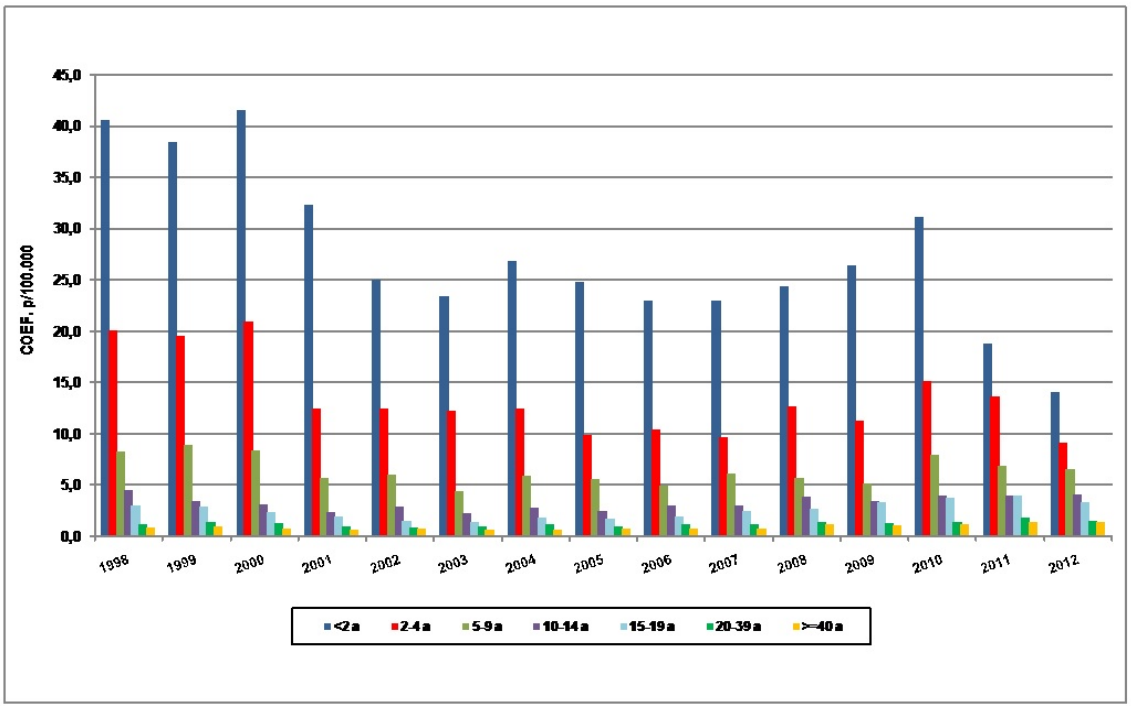
bacteriana tem sido relacionada com o fator prognóstico de falência múltipla dos órgãos. A endotoxina é liberada na forma de vesículas de membrana externa (OMVs) e podem ser visualizadas no plasma e fluido cérebro-espinhal por microscopia eletrônica, durante a doença invasiva (BRANDTZAEG, 1992).

O risco de adquirir a doença existe em todas as faixas etárias, mas é inversamente proporcional à idade, sendo a criança que possui idade entre seis meses a um ano encontra-se no período mais suscetível. As alterações climáticas influenciam a dinâmica da transmissão da doença e as epidemias são mais frequentes no inverno nas regiões temperadas e nas estações secas em regiões tropicais (STEPHENS et al., 2007).

Os surtos podem ocorrer a intervalos irregulares e são frequentemente associados com a introdução de uma nova cepa virulenta na comunidade (CVE).

Crianças recém - nascidas são altamente resistentes à meningite meningocócica, tornando-se extremamente susceptíveis após os seis meses de idade. Isso ocorre pela imunização passiva da passagem de imunoglobulinas especialmente as do tipo IgG pela placenta. Dos 2 aos 12 anos há um aumento progressivo do título de anticorpos bactericidas contra a doença. Foi feita uma relação da idade e doença meningocócica, sendo que o nível de anticorpos bactericidas é idade dependente (GOTSCHLICH et al., 1969).

Figura 2 - Incidência da doença meningocócica por faixa etária, no estado de São Paulo, de 1998 a 2012.



As mais acometidas pela doença meningocócica são as crianças menores de dois anos de idade, e em seguida, crianças com faixas etárias entre 2 a 4 anos. Embora a incidência tenha diminuído de 1998 para os dias atuais, as idades mais acometidas pela doença meningocócica continuam sendo as mesmas. Fonte: SINAN / D.D.T.R. / CVE- dados em 20/05/2013.

1.3 Epidemiologia da doença meningocócica (DM) no Brasil e no mundo

Em 1887, Anton Weichselbaum isolou a bactéria *Neisseria meningitidis* de casos de meningite meningocócica, associando-a como agente etiológico dessa patologia. Esta bactéria pode colonizar a nasofaringe sem provocar doença e ocasionar eventos invasivos, como a doença meningocócica (meningite e/ou meningococcemia) e processos em decorrência da disseminação hematogênica (osteomielite, artrite, pericardite e peritonite). A transmissão se dá por meio de secreção nasal ou oral e, também, por meio de inalação de aerossóis (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Muitos dos dados publicados na literatura sobre a doença meningocócica no Brasil diz respeito aos que foram coletados nas cidades como, São Paulo e Rio de Janeiro,

duas grandes metrópoles, sendo que, na capital paulista, a epidemia veio pela primeira vez em 1906. Historicamente, nosso país vivenciou uma grande epidemia causada pelo sorogrupo A, chegando à incidência de 12-25 por 100,000 habitantes nos anos 20 e 40 (MORAES; BARATA, 2005). Na década de 70, o Brasil sofreu duas epidemias sobrepostas, uma causada pelo sorogrupo C e outra pelo sorogrupo A (MORAES; BARATA, 2005). Entre os anos de 1990-2002, a média anual da incidência da DM na grande São Paulo foi de 6 para 100,000 habitantes, com 59% de DM causada pelo sorogrupo B e 36% causada pelo sorogrupo C. Durante alguns anos no Estado de São Paulo, o sorogrupo B foi prevalente sobre o C (59% e 33%, respectivamente) com diminuição de casos pelo sorogrupo A. Como observado no quadro 1, até o ano de 2001, o sorogrupo B foi prevalente sobre o C. Depois, ao longo dos anos, até os dias atuais, o sorogrupo C tem sido o maior responsável pela causa da DM na população do Estado de São Paulo, e o sorogrupo A não tem sido mais identificado (CVE, 2012).

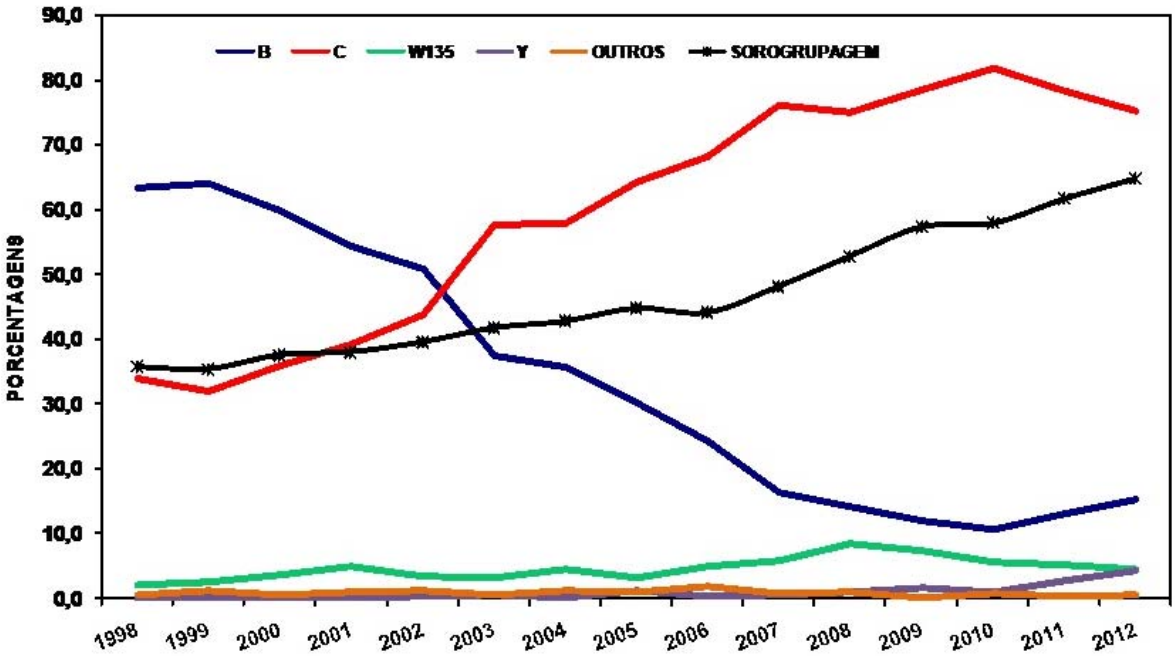
Quadro 1 – Doença meningocócica: casos e porcentagens por sorogrupo no estado de São Paulo, de 1998 a 2013.

SOROGRUPO	B		C		W135		Y		OUTROS		TOTAL	
ANO	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%
1998	367	63,4	197	34,0	12	2,1	0	0,0	3	0,5	579	100,0
1999	370	64,1	185	32,1	14	2,4	1	0,2	7	1,2	577	100,0
2000	369	60,0	221	35,9	22	3,6	0	0,0	3	0,5	615	100,0
2001	246	54,5	177	39,2	22	4,9	1	0,2	5	1,1	451	100,0
2002	228	50,9	197	44,0	15	3,3	2	0,4	6	1,3	448	100,0
2003	164	37,6	252	57,8	14	3,2	3	0,7	3	0,7	436	100,0
2004	187	35,8	303	58,0	24	4,6	1	0,2	7	1,3	522	100,0
2005	154	30,2	328	64,3	16	3,1	7	1,4	5	1,0	510	100,0
2006	125	24,3	352	68,3	26	5,0	2	0,4	10	1,9	515	100,0
2007	91	16,5	420	76,2	32	5,8	4	0,7	4	0,7	551	100,0
2008	98	14,3	512	75,0	58	8,5	8	1,2	7	1,0	683	100,0
2009	86	12,1	557	78,6	52	7,3	13	1,8	1	0,1	709	100,0
2010	90	10,7	686	81,9	47	5,6	9	1,1	6	0,7	838	100,0
2011	110	13,1	657	78,3	44	5,2	24	2,9	4	0,5	839	100,0
2012	116	15,3	570	75,3	34	4,5	33	4,4	4	0,5	757	100,0
2013	31	21,1	102	69,4	7	4,8	7	4,8	0	0,0	147	100,0

Total= total de sorogrupados. Fonte= SINAN/DDTR/CVE/CCD/SES-SP – dados em 20/05/2013

A grande incidência da doença meningocócica ocorre na África, região conhecida como “cinturão da meningite”, onde o sorogrupo A é responsável pela maioria dos casos epidêmicos, ocorrendo também pelos sorogrupos C, X e W135. Ainda se referindo ao sorogrupo A, casos também foram descritos na China e Rússia, mas se tornaram raros em outras partes do mundo. O sorogrupo B causa uma substancial proporção de doença meningocócica (DM) endêmica em muitas áreas no mundo, incluindo EUA e Europa, tornando-se um dos sorogrupos de maior associação com a doença invasiva, juntamente com o sorogrupo C (COHN et al., 2010). Felizmente, DM causadas pelos sorogrupos A, C, Y e W135 podem ser eficientemente preveníveis até mesmo em pacientes mais novos pelas vacinas que contêm polissacarídeos capsulares específicos conjugados (TROTTER et al., 2004).

Figura 3 – Distribuição percentual por sorogrupo da doença meningocócica no estado de São Paulo, no período de 1998 a 2012.



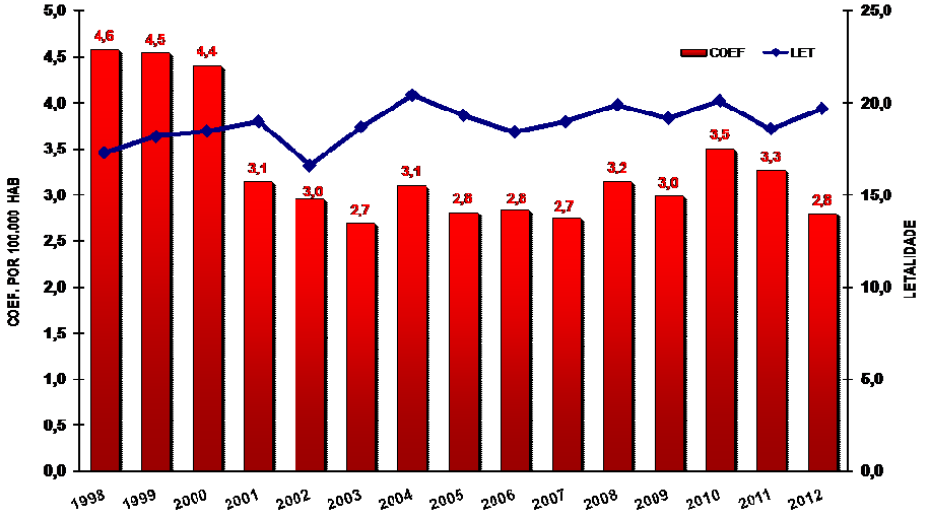
Fonte: SINAN / D.D.T.R. / CVE – dados em 20/05/2013.

No Estado de São Paulo, o sorogrupo que mais causa DM nos dias atuais é o C, sendo que o sorogrupo B têm diminuído sua incidência (Figura 3).

Vacinas conjugadas para o meningococo C foram licenciadas e recomendadas para as populações de risco, entrando no calendário vacinal infantil e distribuídas nas redes públicas de saúde à partir de 2011 no estado de São Paulo (CVE). A vacina meningocócica conjugada C distribuída nas redes públicas de saúde protege contra o sorogrupo C, e foi aprovada para ser administrada a partir dos 2 meses de idade, induzindo a produção de anticorpos de longa duração. Na rede pública do estado de São Paulo, está indicada para controle de surtos/epidemias e para os grupos de risco. Essas vacinas estão disponíveis nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais - CRIE (CVE).

No mundo, as infecções causadas por meningococos continua sendo um sério problema de saúde, sendo infectadas de 500,000 a 1,2 milhões de pessoas e matando entre 50,000 a 135,000 por ano (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). A mortalidade global para a DM é de aproximadamente 10% dos indivíduos infectados, mas pode ser de até 40% nos casos de septicemia pelo meningococo. Nos últimos anos, conforme mostra a figura 3, no estado de São Paulo, a taxa de incidência de meningite por *N. meningitidis* declinou de 4,6 para 2,8 por 100.000 habitantes.

Figura 4 – Incidência e letalidade da doença meningocócica no estado de São Paulo, de 1998 a 2012.



Fonte: SINAN / D.D.T.R. / CVE – dados em 20/05/2013.

1.4 Fatores de virulência e mecanismos de escape de *Neisseria meningitidis*

Dentre os fatores de virulência da bactéria, podemos enquadrar os que estão relacionados com a adesão, como as fímbrias/pili, cápsula e vesículas (OMVs). As fímbrias ou pili são apêndices de superfícies, estruturas filamentosas que possuem um importante papel na aderência das bactérias à superfície das mucosas (STEPHENS; FARLEY, 1991). Isso se explica pelo fato de as estruturas filamentosas protéicas glicosiladas promoverem adesão às células epiteliais e endoteliais humanas, que atravessam a cápsula polissacarídica e se ligam a receptores nas células nasofaríngeas (POLLARD; FRASCH, 2001). Por isso, a presença de fímbrias está associada à virulência, sendo imprescindível para que a bactéria colonize e infeccione o hospedeiro (MEYER, 1990).

O lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um dos maiores fatores de virulência do meningococo assim como de todas as bactérias Gram-negativas, e são substâncias que estimulam a imunidade inata, provendo a inflamação (POOLMAN, 1995; VOGUEL et al., 1999). Os lipooligossacárides (LOS) são estruturas encontradas nos gêneros

Neisseria, *Haemophilus* e *Bordetella* e são glicolípides de membrana externa de bactérias que colonizam a superfícies das mucosas respiratórias . Seu arranjo pode influenciar diretamente na exposição de proteínas de membrana externa (POOLMAN et al., 1985).

N. meningitidis possui uma variedade de mecanismos de variabilidade antigênica (HARRISON, 2006). A variabilidade antigênica ocorre principalmente na transferência horizontal, a qual permite ao microrganismo adquirir longas sequências de DNA. Também pode ocorrer a conversão de genes, que é um processo de recombinação autólogo e não necessita da aquisição de DNA de outra cepa (HOWELL-ADAMS; SEIFERT, 2000).

A mudança de cápsula é o mecanismo pelo qual o meningococo pode alterar seu fenótipo capsular. Os surtos por esta bactéria podem ter início, inclusive, pela mudança de cápsula, pois acredita-se que a população previamente imunizada contra os sorogrupos originais encontra-se desprotegida pelo novo sorogrupo (SWARTLEY et al., 1997). Este mecanismo provavelmente ocorre durante a co-colonização da faringe por duas ou mais cepas. Mudanças antigênicas sofridas em antígenos de OMPs não-capsulares também podem ocorrer e estão associadas a um aumento na incidência da DM. Com relação ao hospedeiro, a falta de anticorpos bactericidas no soro (SBA) é um dos principais fatores do hospedeiro responsável pelo maior risco em crianças.

1.5 Mecanismos da resposta imune durante a colonização por *N. meningitidis*

A porta de entrada dos meningococs é a mucosa da nasofaringe. Danos no epitélio ciliado deste local podem contribuir para a colonização do meningococo, sendo que, o hábito de fumar, seja ativo ou passivo, pode aumentar os riscos de um indivíduo se tornar portador ou desenvolver a doença invasiva (STEPHENS et al., 1986). Os meningococos atravessam o epitélio da mucosa via vacúolos fagocíticos, como resultado da endocitose (READ et al., 1995). A defesa do hospedeiro é determinada pelas respostas humoral e celular, com a produção de anticorpos específicos. Todavia, a defesa inicial é dependente da resposta inata que, fundalmentalmente, possui

mecanismos mediados pela bacteriólise induzida pela ativação do sistema complemento e opsonofagocitose (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

Após a entrada na circulação sanguínea, a capacidade de *N. meningitidis* de colonizar e causar altos níveis de bacteremia está relacionada com a habilidade deste patógeno de escapar do sistema imune humano. Dentre os fatores deste mecanismo, podemos citar alguns que contribuem para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro.

- A ampla variação de antígenos de superfície entre as cepas meningocócicas provavelmente seja o principal obstáculo frente ao desenvolvimento de novas vacinas e de imunidade de memória contra a DM. As células dendríticas (DC), presentes no tecido periférico, superfície de mucosas e circulação, são cruciais para o desenvolvimento da resposta imune. Na colonização por cepas de meningococos selvagens, onde esta bactéria apresenta-se encapsulada, a aderência às DCs é menor (KOLB-MAURER et al., 2001). Os níveis de interleucinas IL-10 e IL-12, que ajudam a diferenciar a resposta para Th1 e auxiliar na resposta adaptativa, respectivamente, estão alterados quando as DCs encontram-se infectadas com o meningococo B (JONES et al., 2007).

- A cápsula polissacarídica permite a entrada do microrganismo na corrente sanguínea e juntamente com o lipopolissacarídeo contribui para inibir a lise e opsonização pelo complemento (GEOFROY et al., 2003). A modificação do lipooligossacáride (LOS) pela adição de um resíduo de ácido siálico sobre o terminal galactose, também pode permitir a fuga da bactéria do sistema complemento (PARSONS et al., 1989).

- A expressão de proteínas de adesão também contribui para a virulência, como os píli que permitem movimento e aderência em células epiteliais, endotoxinas e LOS que se ligam ao receptor TLR-4, produzindo inflamação aguda vascular e cerebroespinhal (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). Um fator fundamental para a patogênese da doença é a habilidade da bactéria se aderir ao receptor CD46 (JOHANSSON et al., 2003). Estudos apontam que um tipo de pili reconhece o

receptor CD46 e estabelece a uma comunicação entre a célula alvo e a bactéria durante a fase inicial de infecção (SOUZA; SEGURO, 2008).

- Proteínas envolvidas na aquisição do ferro (IROMPS) permitem aos meningococos adquirir o ferro da transferrina humana através de proteínas que se ligam à transferrina (Tbp), lactoferrinas e grupo heme da hemoglobina do hospedeiro. Outro fator que garante a sobrevivência da bactéria e que tornou-se um dos antígenos promissores para o desenvolvimento de uma vacina está relacionado a uma lipoproteína de superfície presente em todas as cepas meningocócicas, a fHbp (MASIGNANI et al., 2003; FLETCHER et al., 2004). Sua função é ligar-se na proteína do complemento humana, a fH, acelerando a diminuição de C3 e C5 convertase e inibindo o sistema complemento pela Via Alternativa (MANDICO et al., 2006).

- *N. meningitids* possui uma biologia dinâmica em que frequentemente sofre variabilidade antigênica para escapar dos anticorpos produzidos pela vacinação ou pela imunidade protetora natural (DAVIDSEN; TONJUM, 2006; HILL et al., 2006). Mecanismos de variabilidade genética incluem transferência horizontal de sequências de DNA (KRIZ et al., 1999), variação de fase (VAN DER ENDE et al., 1999; BERRINGTON et al., 2002), conversão de genes e recombinação homóloga (SWARTLEY et al., 1997; BUDRONI et al., 2011). Como exemplo, a mudança de cápsula, que ocorre por transferência horizontal, permite que a bactéria mude a biossíntese dos genes responsáveis pela estrutura capsular específica para aquele sorogrupo, resultando na mudança de seu fenótipo capsular (KRIZ et al., 1999; SWARTLEY et al., 1997).

- A ausência de anticorpos bactericidas é o maior fator de risco para que o hospedeiro desenvolva uma doença invasiva. Para que uma vacina seja protetora, deve estabelecer anticorpos no soro tanto de indivíduos expostos quanto dos anteriormente vacinados (RODRIGUEZ et al., 1999). Um aumento de anticorpos contra proteínas de membrana externa, que embora isoladamente não tenham poder bactericida, podem agir sinergicamente com os anticorpos anti-

polissacarídicos pré-existentes para elevar a atividade bactericida contra o meningococo B (MACDONALD et al., 1998).

1.6 Vacinas meningocócicas

Nos anos 60 foram desenvolvidas vacinas polissacarídicas baseadas nas cápsulas dos grupos A e C (GOTSCHLICH et al., 1969). Hoje já podemos contar com uma vacina quadrivalente que confere proteção contra os tipos A, C, W135 e Y (LEPOW et al., 1999). Embora disponíveis para a população, as vacinas polisacarídicas tem sido substituídas por vacinas conjugadas de proteínas e polissacarídeos, já que, polissacarídeos por si só promovem resposta imunológica fraca em bebês e crianças. A segunda razão para a substituição por vacinas conjugadas é de que os anticorpos presentes no soro de crianças entre 0 a 24 meses geralmente possuem curta duração, e, mesmo em crianças mais velhas e adultos a resposta imunológica protetora dura aproximadamente 5 anos (McDONALD et al., 1998).

Uma vacina preventiva ideal para a DM deve ser efetiva contra todos os sorogrupos invasivos meningocócicos, e deve promover imunidade duradoura em todas as faixas etárias, especialmente em bebês, crianças e adolescentes.

Em 1981, a vacina polissacrídica Menomune®, licenciada pela Sanofi-Pasteur era baseada no antígeno polissacarídeo capsular conjugado com a proteína da toxina diftérica e é efetiva contra os sorogrupos A, C, Y e W-135 (GIRARD et al., 2006). Devido à baixa eficácia após repetidas doses, novas vacinas conjugadas foram introduzidas e desenvolvidas. Em 2000, foram desenvolvidas vacinas trivalentes (A, C, W-135) e tetravalentes (A, C, Y e W-135) patenteadas pela Sanofi-Pasteur, e mais recentemente, pela Novartis (WHO - OMS). A introdução de novas vacinas conjugadas e a adição destas no calendário vacinal infantil resultou em uma diminuição de 90% do número de mortes e casos clínicos no Reino Unido (MILLER; SALISBURY; RAMSAY, 2001).

No século 21, vacinas multivalentes conjugadas tem sido desenvolvidas, incluindo, em 2005, a vacina Menactra®, também pela Sanofi-Pasteur (Pasteur Inc.

Swiftwater PA 18370 USA , contra os sorogrupos A, C, Y e W-135. Em 2010, uma vacina similar, Menveo®, foi patenteada pela Novartis. Essas duas vacinas foram aprovadas para uso nos Estados Unidos, porém, Menomune® é a única recomendada para uso em indivíduos com mais de 55 anos (GIRARD et al., 2006).

O polissacarídeo do sorogrupo B de *N. meningitidis* não está incluso em nenhuma vacina meningocócica conjugada, devido à homologia estrutural entre os polissacarídeos da cápsula deste sorogrupo e as moléculas de adesão celular dos neurônios (NCAM, do inglês *Neural Cell Adhesion Molecule*). Dentre os esforços para desenvolver uma vacina específica para o sorogrupo B está a utilização de vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer Membrane Vesicles*) ou OMPs conservadas e comprovadamente antigênicas provindas do meningococo deste sorogrupo (HOLST, 2009). Além da cápsula polissacarídica deste sorogrupo ser pouco imunogênica e conferir autoimunidade, há um outro fator que pode dificultar a busca por uma vacina, como a ocorrência de novos sorogrupos de cepas B e da diversidade clonal complexa, desafiando a formulação de uma vacina que abrangesse proteção a todos os sorotipos. Embora existam muitos estudos para uma vacina contra o meningococo B, ainda não há uma vacina efetiva. Países como Brasil, Cuba, Canadá, USA, Holanda, Noruega e nova Zelândia, que tiveram epidemias durante as duas últimas décadas, têm investido bastante em pesquisas na busca de uma vacina para a DM causadas por este sorogrupo no Brasil (DE GASPARI, 1998).

Na tabela 1, segue, em ordem crescente de datas, um breve histórico das vacinas desenvolvidas para meningococos e as que ainda estão em andamento.

Tabela 1 - Histórico de vacinas meningocócicas ao longo dos anos

Antes de 1900	Bactéria inativada
1970	Vacinas polissacarídicas
1992	Primeira vacina conjugada para meningococo A e C
1999	Vacina conjugada para meningococo C licenciada no Reino Unido
2003	Vacina quadrivalente conjugada contra os sorogrupos A, C, Y e W135 licenciada no Reino Unido para menores de 11 anos
2010	Vacina conjugada para meningococo A licenciada para uso na África
2012/2013	Vacina conjugada para meningococo A, C, Y e W135 aprovada para o uso em crianças menores de dois anos
2012/2013	À espera de aprovação para vacina proteica para meningococo B

Fonte: Black et al.(2012).

1.7 Vacinas meningocócicas para o sorogrupo B testadas/em desenvolvimento

As pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de vacinas contra o sorogrupo B têm focado em antígenos baseados em estruturas de membrana diferente dos polissacarídeos. Em 1997, a Noruega desenvolveu um candidato vacinal em uma

preparação antigênica hexavalente para PorA de OMVS. A administração desta levou a uma forte resposta de linfócitos B e induziu a formação de anticorpos bactericidas no soro (VAN DER VOORT et al., 1997). Este foi um dos estudos precursores que, mais tarde, levou ao desenvolvimento de vacinas baseadas em PorA no ano de 2000 .

A vacina baseada em PorA foi usada simultaneamente em Cuba, Noruega e nos Países Baixos. Foi usada com sucesso nesses países, com a finalidade de afastar as epidemias causadas pelo sorogrupo B. Em 2006 o Instituto de Saúde Pública da Noruega reviu a eficácia da vacina de Por A, sugerindo que 65% dos adolescentes que receberam a vacina produziram títulos de anticorpos bactericidas após 3 doses, as quais foram administradas no intervalo de seis semanas cada. Após o acompanhamento de 10 semanas, esta proporção diminuiu para 28%, embora uma quarta dose tivesse sido administrada após 1 ano, aumentando os títulos de anticorpos a um nível considerado protetor em mais de 90% dos indivíduos. Porém, ainda não está claro por quanto tempo esta imunidade protetora pode durar (FEIRING et al., 2006).

MeNZB™ é uma vacina de OMVS desenvolvida pela Nova Zelândia a partir da cepa P1.7b,4 e contém porinas A e B, LOS. No estudo da fase II de lactentes saudáveis, 74% dos vacinados exibiram boa resposta de anticorpos no soro após 3 doses e os efeitos adversos não foram observados (JACKSON et al., 2009). Ensaios clínicos adicionais sugeriram que quatro doses promoveram a produção de anticorpos bactericidas na maioria dos adolescentes e crianças testadas (O'HALLAHAN; LENNON; OSTER, 2004). Desde o ano de 2004, esta vacina tem sido administrada em toda Nova Zelândia (MCNICHOLAS et al., 2007).

Em Cuba, foi desenvolvida VA-MENGO-BC®, contra os sorogrupos B e C. A vacina conjugada é baseada em OMVS do sorogrupo B da cepa B:4:P1.19, 15:L3, 7,9 e do polissacarídeo capsular purificado do sorogrupo C, da cepa C11. A administração desta vacina em 15 países foi responsável pela diminuição da incidência da doença (PADRON et al., 2007).

Várias vias de administração de vacinas têm sido estudadas, assim como outras vacinas baseadas em outras proteínas de membrana do meningococo como antígeno, para melhorar a resposta imune (OLIVER et al., 2002).

Tabela 2 - Vacinas desenvolvidas contra o soro grupo B de *N. meningitidis*.

Localização	Período de estudo	Nome da vacina e classificação sorológica	Idade do grupo	Design do estudo	Número de doses (n)	Controle / placebo	Número de pessoas vacinadas	Eficácia da vacina ou SBA 4x aumentada no soro
Cuba (Instituto Finlay)	1987-1989	VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	10-14 anos	Double-blind, randomizado	2	placebo	106.000	83
Iquique, Chile (Walter Reed Army Institute)	1987-1989	VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	5 meses a 24 anos	Double-blind, randomizado	2	placebo	133.000	83-94
Noruega (Instituto Norueguês de Saúde Pública)	1988-1991	MenBvac B:15:P1,7,16	13-21 anos	Double-blind, randomizado	2	placebo	171.800	57.2
São Paulo, Brasil	1989-1990	VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	3 meses a 6 anos	Retrospectivo Caso-controle	2	Não aplicável	2.4 milhões	47-74
	1990-1991	VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	3 meses a 6 anos	Retrospectivo Caso-controle	2	Não aplicável	621	0-74
Santiago, Chile	1994	MenBvac B:15:P1.7,16	Menores de 12 meses	Double-blind Randomizado	3	placebo	187	90 C.H
		VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	2-4 anos	Double-blind randomizado			183	≥67 C.H 31-35 C.HE.
			7-30 anos				173	≥67 C.H 37-60 C.HE.

Fonte: Panatto et al.(2011).

Tabela 2 – Continuação: vacinas desenvolvidas contra o sorogrupo B de *N.meningitidis*

Localização	Período do estudo	Nome da vacina e classificação sorológica	Idade do grupo	Design do estudo	Número de doses (n)	Controle / placebo	Número de pessoas vacinadas	Eficácia da vacina ou SBA 4x aumentado no soro
Rotterdam (Países Baixos)	1996	Exavalent PorA-OMV	2-8 anos	Aberto, randomizado	3	HBV	337	16-100
Nova Zelândia (Novartis e Istituto Norueguês de Saúde Pública)	2001-2006 2004-2006	MeNZB B:4:P1.7-2,4 MeNZB B:4:P1.7-2,4	6meses – 20 anos 6 meses a 5 anos	Campanha de vacinação Campanha de Vacinação	3 (4 em bebês depois de 2006) 1-3	Não se aplica	905.507	73
Normândia (França)	2006-2009	MenBvac	2 meses aos 19 anos	Campanha de vacinação	2+1 3+1	Não se aplica	26,014	88 56
Países Baixos	2007	NonaMen PorA OMV	Em camundongos e coelhos		Estudo experimental			
Reino Unido	2009		adultos	Double-blind randomizado	3	placebo	97	8-31
EUA (Walter Reed Army)	2011	NOMV	Adultos	Fase 1 de estudo clínico	3		36	41-81

Fonte: Panatto et al. (2011).

1.7.1 Vacinologia reversa no desenvolvimento de vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B

A maioria das vacinas licenciadas para a proteção contra as doenças causadas pelo sorogrupo B empregam as vesículas de membrana externa. Embora essas vacinas sejam capazes de gerar anticorpos protetores nos soros dos vacinados, a principal limitação de seu uso está na especificidade das cepas das quais são constituídas. Sabe-se que a base para a imunogenicidade dessas preparações antigênicas está focada na PorA, uma proteína de membrana externa da qual possui duas regiões variáveis no DNA, responsáveis pela grande variabilidade nas cepas do sorogrupo B (HOLST et al., 2009). No entanto, avanços tecnológicos para a busca de novos antígenos vacinais contam com a vacinologia reversa, que se baseia em estudos genômicos *in silico* (RAPUOLI, 2001).

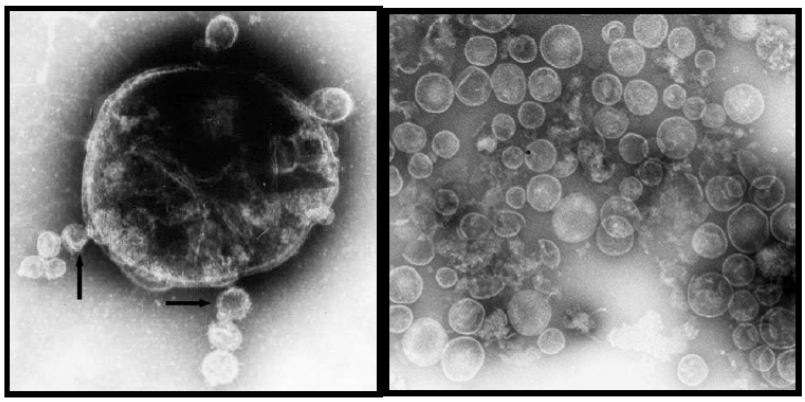
Um dos estudos mais promissores para a vacina do sorogrupo B por vacinologia reversa começou na Itália, a partir da cepa MC58. Foram identificandas 58 novas proteínas do meningococo B, que foram chamadas de antígenos derivados do genoma do meningococo (GNAs, do inglês – *Genome-derived Neisserial Antigens*) (GRIFANTINI et al., 2002). Destas novas proteínas identificadas, as mais promissoras são fHbp (GNA 1870), NHBA (GNA 2132) e NadA (GNA 1994). Se for comprovado que estas proteínas possam ser conservadas em todos os sorogrupos das cepas prevalentes, talvez exista uma chance de que uma vacina única possa conferir proteção contra os cinco grupos que causam DM no mundo (CAESAR; MYERS; FAN, 2013).

A vacinologia reversa também foi usada no desenvolvimento de uma vacina 4MenB, cujo nome, é baseado em sua composição que contém 4 componentes contra o meningococo B. Sua formulação abrange cinco componentes identificados genomicamente: GNA 2132 (NHBA), GNA 1030, GNA 1870 (FHbp), GNA 2091 e GNA 1994 (NadA) (MASIGNANI et al., 2003. Desde o desenvolvimento de vacinas da primeira geração com base em vesículas de membrana externa (OMVs), que foram capazes de conter epidemias de estirpe específica, mas não foram adequados para uso universal, enormes avanços na prevenção de Neisseria meningitidis B foram feitos. A primeira vacina multicomponente, Bexsero ®, recentemente foi autorizada para uso; outras vacinas, rLP2086 bivalente e vacinas OMVS de última geração, estão em desenvolvimento. As novas vacinas podem contribuir substancialmente para reduzir infecções bacterianas invasivas, como eles poderiam cobrir a maioria das cepas de *Neisseria meningitidis* B. Além disso, outros candidatos de vacina potencialmente eficaz sorogrupo B estão sendo estudados em configurações pré-clínicos. É, portanto, adequado rever estudos recentes utilizados na prevenção da doença causada pelo sorogrupo B (GASPARINI et al., 2014).

1.8 Vacinas baseadas em vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B

Zollinger e colalaboradores, em 1972, verificaram que, em cultura, os meningococos apresentam alto grau de autólise e vesiculação da membrana celular, produzindo vesículas, denominadas hoje de OMVs (figura 5). Tais vesículas consistem em uma membrana externa conservada com conformação organizacional estável, incluindo suas características físico-químicas (HOLST et al., 2009). É bem provável que estas estruturas sejam formadas durante o processo infeccioso e liberadas para o meio circulante (SOUZA ; SEGURO, 2008).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de vesículas de membrana externa (OMVs) de meningococo.



As setas indicam formações de vesícula de membrana externa, também conhecidas como “blebs”. Fonte: Souza; Seguro (2008); Holst et al. (2009)

As primeiras tentativas para preparar uma vacina contra o sorogrupo B consistiam no uso destas vesículas (OMVs), que contém muitos antígenos imunogênicos, incluindo os lipooligossacarídeos e PorA. No entanto, o lipooligossacarídeo é uma endotoxina que pode ser perigosa para o hospedeiro, e usualmente, pode ser eliminada com o tratamento de detergentes. A Por A é um dos principais antígenos meningocócicos já que a administração de vacinas baseadas em vesículas de membrana externa provoca uma forte resposta imune contra esta porina.

Porém, também se trata de uma proteína altamente variável em cepas deste sorogrupo, sendo assim, uma vacina baseada em OMVs é apenas efetiva durante o curso de uma epidemia devido a uma única cepa, e que, portanto, expresse a mesma variante de PorA (TONDELLA et al., 2000). Por exemplo, na Nova Zelândia, uma epidemia foi controlada com sucesso após o advento de uma vacina baseada em OMVS, que foi feita especialmente para a cepa prevalente. Entretanto, no Brasil, uma vacina experimental que tinha sido preparada especificamente com base nas características das cepas localmente circulantes provaram ter significativamente menos eficácia (MORAES et al., 1992).

Algumas vacinas foram desenvolvidas baseadas em múltiplas OMVs, a fim de conseguir englobar maior número de Por A diferentes para abranger uma resposta cruzada e maior número de cepas. Os primeiros estudos que consistiam em OMVs de duas cepas distintas, das quais se contava com três proteínas para PorA diferentes, mostrou que embora a vacina fosse segura e bem tolerada, em termos de imunogenicidade ela era relativamente pobre. Quando administrada em lactentes, para ocorrer a produção de anticorpos PorA específicos foram necessárias quatro doses da vacina. Isso levou a mais outros estudos, com três OMVs, contendo nove proteínas para PorA, que foram imunogênicas quando testadas em camundongos, sendo atualmente avaliada em ensaios clínicos em humanos (PRINCIPI & ESPOSITO ,2011).

Para aumentar a imunogenicidade destas vacinas, OMVs nativas (NOMVs), isto é, não tratadas com detergente, foram preparadas a partir de cepas meningocócicas com baixos níveis de endotoxina ou com endotoxinas modificadas geneticamente. Vacinas que continham NOMVs não se mostraram imunogênicas em camundongos. Os estudos com vacinas baseadas em OMVs de *N. meningitidis* sugerem que uma vacina com múltiplos antígenos provavelmente possa abranger uma grande parte de cepas meningocócicas, assegurando assim, melhor resposta imune e consequentemente melhor proteção contra a DM. No entanto, a otimização de vacinas baseadas em OMVs requerem ainda mais informação sobre a importância do número de antígenos que deve conter, da possível interferência de outras porinas e outros antígenos, assim como

o papel de outros componentes imunogenicamente ativos das vesículas (PRINCIPI; ESPOSITO, 2011).

1.9 Avidez dos anticorpos produzidos na imunização

Durante a reação imune, o primeiro anticorpo a ser produzido nas respostas celulares primárias são os da classe IgM, que possuem ainda baixa afinidade pelo antígeno. Com a progressão da resposta imune e a maturação dos linfócitos B, aumenta a afinidade das imunoglobulinas pelo antígeno, ocorrendo uma mudança de classe de IgM para IgG, fenômeno que exige a seleção de clones celulares de alta afinidade com maior capacidade de reconhecimento de agentes externos (GRANOFF et al., 1998). Em alguns casos, a quantidade de anticorpos bactericidas presentes no soro se torna limitada, como ocorre nos casos de crianças menores de dois anos que recebem vacinas polissacarídicas. GRANOFF et al. (1998), desenvolveram um ensaio de ELISA do qual utiliza um agente caotrópico, como o tiocianato de potássio (KSCN), e assim conseguiram medir as concentrações de anticorpos anti-capsulares para o meningococo C. Os resultados da capacidade de ligação dos anticorpos produzidos por indivíduos imunizados, medida no ensaio de avidez, apresentou correlação linear com a atividade bactericida nos soros. Para o ensaio de avidez, diferentes substâncias caotrópicas podem ser utilizadas, e são capazes de causar alterações na força iônica das ligações antígeno-anticorpo, determinando a eluição de ligações fracas, ou seja, as de baixa avidez, enquanto que moléculas de alta ligação não são eluídas (GRANOFF et al., 1998).

O ensaio de avidez é muito útil para diferenciar as respostas imunes primárias e secundárias. Têm sido utilizados para o diagnóstico de infecções virais, para discriminar infecções primárias e reinfecções ou reativações e para determinar a eficácias ou falhas vacinais.

1.10 Adjuvantes

Adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que potencializam a resposta imune frente a diferentes antígenos (JENNER, 2010). Um bom adjuvante não deve promover alta toxicidade, e ao mesmo tempo, deve aumentar, sustentar e direcionar a imunogenicidade dos antígenos, modulando a resposta imune de forma apropriada. Também deve se levar em conta, que reduzir a quantidade de antígeno ou o número de imunizações requeridas para uma boa resposta imunológica, conferir imunidade para todas as faixas etárias e em imunodeprimidos é indispensável para caracterizar uma molécula como bom adjuvante (KENNEY; EDELMAN, 2003).

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com sua origem, propriedades bioquímicas ou mecanismos de ação. Um dos critérios para se escolher o adjuvante ideal é saber se possui formulação apropriada para se obter o máximo de seu efeito em uma composição vacinal, se tem boa estabilidade, a natureza do antígeno a ser usado (se é solúvel ou particulado), o tipo de resposta imune desejada (Th1 ou Th2), a rota de apresentação deste antígeno, os efeitos colaterais e a estabilidade deste na vacina. Deve ser seguro, estável após a sua administração no organismo, rapidamente biodegradável , de baixo custo e fácil execução, capaz de promover resposta antígeno-específica (LAMBRECHT, 2009).

Classicamente são conhecidos alguns tipos de adjuvantes: emulsões saponinas, sais de alumínio ou cálcio, polímeros surfactantes não-iônicos, derivados de lipopolissacarídeos (LPS), micobactérias entre outros (OGRA et al., 1996).

1.11 Hidróxido de alumínio como adjuvante

Formulações que levam hidróxido de alumínio em sua composição possuem muitos registros que comprovam sua segurança como adjuvante (REED et al., 2009). É usado como adjuvante vacinal há mais de 80 anos (BREWER, 2006). Capaz de reter os antígenos nas áreas em que foram inoculados, possuem liberação lenta, e podem ser fagocitados pelas células apresentadoras de antígeno. Consequentemente à sua

atuação como adjuvante, o hidróxido de alumínio promove resposta imune humoral promovida por célula Th2 e formação de anticorpos pelos linfócitos B (BREWER et al., 1999). Mais recentemente, foi sugerido que os antígenos absorvidos pelos sais de alumínio são apresentados de forma multivalente, fazendo com que sejam mais eficientemente internalizados pelas APCs (MOREFIELD et al., 2005). Também foi visto que os componentes do complexo “inflamassoma” aumentam cictocinas pro-inflamatórias como IL-β e IL-18 (LAMBRECHTet al , 2009).

Por outro lado, o hidróxido de alumínio pode levar à formação de granulomas nos locais onde foram injetados, sendo esta uma das razões pelas quais as vacinas que levam este composto requererem frequentemente outras doses para não prejudicar o tecido inoculado (NICHOLLS; MADERA; HANCOCK, 2010).

1.12 Emulsões

Anteriormente, os adjuvantes água – em – óleo eram muito reatogênicos para serem usados em humanos e seu uso foi descontinuado. Com pesquisas mais recentes feitas nos materiais de base desta formulação, novas versões de emulsões água – em – óleo, das quais são mais aceitáveis para o uso em vacinas, surgiram. Uma das que passam pela fase de estudos clínicos são emulsões de Montanide (AUCOUTURIER et al., 2002), uma família de adjuvantes usada principalmente em vacinas para câncer (BARVE et al., 2008).

Em adição, emulsões óleo-em-água também foram desenvolvidos, mas o mecanismo de ação deste tipo de adjuvante ainda não está completamente esclarecido. Acredita-se que envolva a resposta imune inata, recrutamento e ativação de APCs, melhora a persistência do antígeno nos locais de injeção e a apresentação deste para as células imunes competentes, e pode restimulação de muitas vias diferentes de citocinas (GARCON; CHOMEZ; VAN MECHELEN, 2007). Um dos exemplos de emulsões óleo-em-água é o MF59, que foi licenciado para uso como adjuvante na vacina da influenza *Fluad*™, da qual mostrou estimular resposta imune humoral pela da via Th2, e também conseguiu uma boa resposta imune em idosos (PODDA, 2001).

Comparado com as emulsões água-em-óleo, as óleo-em-água tem melhorado os perfis de reatogenicidade.

1.13 Lipossomas como adjuvantes

A proteção limitada fornecida pela maioria das estratégias de vacinação direcionou as pesquisas focadas no desenvolvimento de adjuvantes efetivos e sistemas de liberação controlada (CUNHA, 2008). Os lipossomas são estruturas vesiculares que possuem tamanho entre 0,05 e 50 nm (nanômetros), formadas basicamente de fosfolipídios organizados em bicamadas (BANGHAM et al., 1964). Eles são formados espontaneamente , quando lipídios anfifílicos são dispersos em água. Assim se explica que os componentes formadores dos lipossomas se agregam formando bicamadas, que se fecham sobre si mesmas, onde as estruturas esféricas englobam parte da solução de fármaco em seu interior (PRISTA et al., 1981).

Como vantagens, os lipossomas funcionam como ótimos vetores quando presentes em preparações vacinais, dentre elas, destacamos a redução da dose necessária para a imunização, levando um menor evento de hipersensibilidade (UCHIDA, 2003). A maior proposta de utilização dos lipossomas está na liberação lenta de antígenos encapsulados (MAZUMDAR et al., 2004). Outras vantagens em relação aos adjuvantes tradicionais são: não formam granulomas no sítio de injeção, não produzem reações de hipersensibilidade, não estimulam a produção de anticorpos contra o componente fosfolipídico, não possuem efeitos colaterais na apliacação de mais doses, baixa toxicidade, biodegradáveis, podem ser produzidos de forma sintética, podem ser usados em composições que possuem antígenos bacterianos, virais, protozoários e tumorais. A imunização produzida gera anticorpos IgM e IgG (FRÉZARD, 1999).

1.14 Virossomas

Os virossomas são constituídos de envelopes virais vazios de influenza vírus, e seu modo de ação é similar ao do lipossoma, porém, com a vantagem de que possui

glicoproteínas do envelope viral, das quais se espera q auxilie na captação celular e na fusão da membrana para a apresentação do antígeno às células alvo (MOSER et al., 2011). Vacinas que utilizam virossomas como adjuvante incluem as licenciadas para hepatite A; *Epaxal*™, e para influenza, *Inflexal*™ e *Invivac*™ (BOVIER, 2008).

1.15 Novos adjuvantes

Toll – like receptor agonists

Os TLRs são um exemplo de receptores que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos, encontrados nas células do sistema imune inato. Sua descoberta e o reconhecimento da ligação entre a resposta imune inata e adaptativa possibilitou o subsequente desenvolvimento de uma série de novos adjuvantes e imunopotencializadores. Os imunopotencializadores exercem suas funções estimulando diretamente macrófagos, monócitos e DCs. Um exemplo é o MPL (monofosforil lipídio A), que consiste em um tipo de LPS detoxificado de *Salmonella minesota*. Este adjuvante se liga ao TRL-4, atuando nas células do sistema imune inato de acordo com o mesmo mecanismo natural de ação do LPS. Assim, estimula a expressão de moléculas co-estimuladoras e a produção de citocinas, melhorando qualitativa e quantitativamente as respostas imunes humoral e celular, dependendo do antígeno a ser usado (SKEIKY et al., 2004).

Outro exemplo de TLRs são as sequências imunoestimulatórias de DNA microbiano, conhecidas por ISS (HIGGINS et al., 2007). Quando reconhecidas pelos TLRs das células do organismo, pode levar a uma amplificação da resposta imune adaptativa seguida da resposta imune inata. Em caráter preliminar, foi sugerido que vacinas que utilizam os ISS como adjuvantes melhora a resposta imune humoral e celular aos antígenos presentes nas vacinas (HIGGINS et al., 2007).

Saponinas

As saponinas derivam de plantas. Quil A por exemplo, é uma saponina natural extraída de uma árvore existente na América do Sul *Quillaja saponaria* (GARCON; HEPPNER; COHEN 2003). Seus primeiros usos foram em vacinas veterinárias, no entanto seu uso em humanos não foi seguido devido a sua alta reatogenicidade. Uma fração purificada de Quil A, chamada de QS21, demonstrou habilidades adjuvantes potentes, melhorando a apresentação do antígeno às APCs e induzindo o aumento na proliferação de CTLs, evidenciando a secreção de citocinas para respostas Th1 e Th2 em modelos animais (NEWMAN et al., 1997).

Complexos Imuno-estimulatórios (ICOMs)

Os ICOMs são complexos formados por lipídios, colesterol, antígeno e Quil A. Funcionam através de interações hidrofóbicas que prendem o antígeno proteico e os levam às APCs por endocitose. Pesquisas sugerem que este tipo de adjuvante promove altos títulos de anticorpos assim como respostas T citotóxicas e auxiliares em modelos animais (SKENE; SUTTON, 2006). Outro exemplo é o ISOCOMATRIX, que essencialmente possui a mesma estrutura dos ICOMs, porém sem a capacidade de incorporar o antígeno, assim, as vacinas são formuladas com a adição dos antígenos, e podem ser usados a uma grande variedade de destes, desde que suas membranas proteicas hidrofóbicas limitadas não sejam limitadas (PEARSE; DRANE, 2005). Podem levar à apresentação de antígeno pelo MHC de classe 1 e de classe 2 (PEARSE; DRANE, 2005).

A atual aplicação dos ICOMs incluem o desenvolvimento por uma vacina para a influenza, e o ISOCOMATRIX está sob avaliação em candidatos vacinais para a hepatite C (DRANE et al., 2009).

Sistemas Adjuvantes

A necessidade do desenvolvimento de vacinas com a habilidade de gerar uma resposta imune efetiva adaptada ao patógeno e a população alvo, promoveu pesquisas que possibilitaram a combinação de antígenos com mais de um adjuvante, os

chamados Sistemas Adjuvantes. Esta abordagem introduz o conceito de que a interação com a resposta imune inata e o subsequente efeito na resposta imune adaptativa pode ser ainda mais modulado quando usamos uma combinação de mais de um adjuvante. O mecanismo envolve o princípio de que a ativação de APCs pode ocorrer em vários níveis, deste modo, orienta melhor o percurso da resposta adaptativa e induz resposta imune mais robusta. MPL e QS21, em combinação com adjuvantes clássicos (sais de alumínio, emulsões óleo – em – água, lipossomos) são as chaves dos sistemas adjuvantes ASO4, ASO2, ASO1 e AS15, desenvolvidos principalmente pela indústria farmacêutica GSK. Cada um foi desenvolvido para estimular de formas diferentes a resposta imune, de acordo com a natureza do antígeno e a especificidade da resposta (LEROUX-ROELS, 2010).

1.16 Brometo de dioctadecildimetilamonium (DDA)

Muitos anos atrás, GALL (1966), já havia demonstrado que o cloreto de dimetilamônio era formado por várias aminas quaternárias e que possuía efeito adjuvante promovendo tanto resposta imune humoral quanto celular. Entre muitas aminas quaternárias das quais já havia sido demonstrado seu efeito adjuvante, o cloreto de dimetilamônio DDA pareceu ser o mais promissor. Desde então, muitas investigações se prosseguiram e confirmaram esta informação. DDA pertence a um grupo de aminas quaternárias lipofílicas, carregado positivamente. Possuem afinidade por cargas negativas e por substratos proteicos (RECK, 1983). Disperso em água, o DDA pode formar compostos multivalentes carregados negativamente, sendo um colóide.

DDA pode estimular respostas imunes humorais e celulares contra antígenos de naturezas distintas e de complexidades diferentes. A complexação de antígenos ao DDA, têm demonstrado aumentar a resposta imunológica contra microorganismos íntegros, vírus, proteínas, haptenos quimicamente definidos conjugados a proteínas, conjugados de proteínas e peptídios, antígenos sintéticos, etc (RIJKE et al., 1988).

Vacinas contendo DDA podem ser preparadas pela simples mistura de um antígeno solúvel com uma solução nova de DDA, e a dose efetora deste adjuvante pode variar de acordo com o peso e tamanho do animal, estimulando preferencialmente a produção dos isótipos IgG2a e IgG2b (KATZ et al., 1991). Alguns estudos foram realizados em humanos com toxóide tetânico e linfoblastos autólogos usados como antígeno, demostrando que DDA aumentou ainda mais o título de anticorpos no soro. (VERONESI et al., 1970).

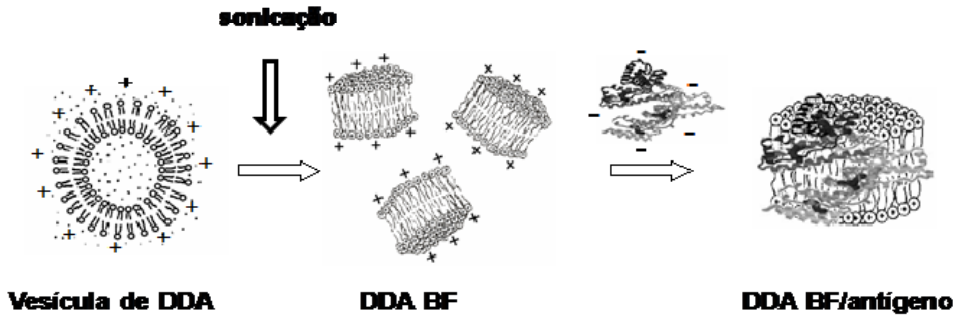
O número de adjuvantes capaz de induzir reações de hipersensibilidade tardia (HTT) é limitado. DDA é efetivo ao induzir HTT em muitos animais pesquisados em laboratório, como visto em resposta a vários antígenos incluindo *Brucella abortus* (DZATA et al., 1991a, b), albumina de soro bovino (GORDON; PRAGUER, 1980), vírus da floresta de Semliki (KRAAJEVELD et al., 1984), toxóide tetânico (GALL, 1966), *Listeria monocytogenes* (WILLERS et al., 1982), arsonato de fosfatidiletanolamina conjugado (HILGERS et al., 1986), arsonato de avoalbumina (VAN HOUTE, 1981).

Quanto à ação do DDA combinado a outros adjuvantes ou imunomoduladores, encontramos, na literatura, vantagens e desvantagens. Por exemplo, DDA foi capaz de estimular a produção de anticorpos contra toxóide tetânico absorvido ao hidróxido de alumínio (VERONESI et al., 1970). Selênio administrado em água para beber teve um efeito adicional na atividade protetora na imunização com antígeno inativo de *Plasmodium berghei* adicionado com DDA (DESOWITZ; BARWELL, 1980). Sulfato de dextran combinado com DDA interagiu de forma sinérgica estimulando a produção de anticorpos contra hemácias de carneiro (SRBC, do inglês *Sheep red blood cells*) em camundongos. Em contraste, o sulfato de dextran diminuiu o poder adjuvante do DDA para reação de hipersensibilidade tardia contra antígenos sintéticos (HILGERS et al., 1986).

O DDA provêm da lecitina da gema do ovo, e, em dispersões aquosas, pode resultar em bicamadas fechadas como vesículas ou lipossomos. Alternativamente, a sonicação do lipídio sintético catiônico DDA, com macrossonda em temperatura acima de 60°C, em solução de baixa força iônica pode resultar em vesículas “interrompidas”

que se resumem em fragmentos de bicamada de DDA (DDA-BF), ou ainda, agregados sob a forma de discos fechados (figura 6) (CARMONA RIBEIRO, 2006). Os fragmentos de bicamada assim produzidos são estáveis em solução aquosa de baixa concentração salina (até 1 mM de NaCl) graças à repulsão eletrostática que impede a eventual coalescência que ocorreria por efeito hidrofóbico (CARMONA-RIBEIRO, 2001). Os fragmentos de bicamada diferem-se das vesículas fechadas por possuírem bordas hidrofóbicas, e, sob condições de baixa força iônica, devido à repulsão eletrostática, a carga do BF permanece coloidalmente estáveis em dispersões aquosas (CARMONA-RIBEIRO, 1992). Como imunoadjuvante, a principal vantagem de usar fragmentos de bicamada, é a baixa concentração de lípide necessária para atingir o efeito desejado, rápida formulação e baixo custo.

Figura 6 – Esquema da formação dos fragmentos de bicamada (BF) de DDA, e os complexos DDA-BF/antígeno.



As dispersões de fragmentos de DDA em NaCl 1 mM foram obtidos por sonicação, de vesículas fechadas, como previamente descrito. Fonte: Vieira; Carmona-Ribeiro (2001).

No que se diz respeito à ativação de macrófagos e células dendríticas, as micropartículas catiônicas, tais como o DDA-BF, são bem efetivas, desde que existam meios que promovam atração eletrostática para ligar e internalizar antígenos dentro desta molécula adjuvante, que serão posteriormente apresentados às células do sistema imune. Por isso, partículas de polímeros catiônicos, como o DDA, carregadas de antígeno, e com carga final positiva, melhoram significativamente a resposta imune,

tanto na produção de anticorpos quanto na proliferação de células T citotóxicas, não sendo necessário para isso, uma grande concentração de antígeno (SINGH, 2000).

Fragmentos de bicamada lipídica são eletricamente positivos e interagem com proteínas por efeito hidrofóbico e repulsão eletrostática, em baixa força iônica (LINCOPAN, 2009).

Uma das maiores vantagens de adjuvantes catiônicos baseia-se na habilidade que este possui ao adsorver antígenos de cargas opostas, como é o caso das OMVs. A complexação entre DDA-BF e as proteínas usadas como antígeno se deve à atração eletrostática e ao efeito hidrofóbico, já que antígenos protéicos devem exibir em altas proporções domínios em alfa-hélice hidrofóbicos, como as estruturas secundárias das quais se converterão para interagir com as bordas também hidrofóbicas do DDA. A carga final deste composto dependerá da natureza protéica e da concentração final usada de DDA (LINCOPAN, 2009).

Possivelmente devido a sua estabilidade química e baixo custo quando comparado com outros lipídios sintéticos e naturais, o uso do DDA como imunoadjuvante tenha se iniciado há 40 anos (GALL, 1966). Isso foi bem antes de ser descrita a formação das bicamadas que ocorrem em solução aquosa, o que, recentemente está sendo investigado com o objetivo destas moléculas participarem como subunidade vacinal (KORSHOLM, 2007).

A vantagem dos fragmentos de bicamada é o seu tamanho, pois o complexo DDA-BF/antígeno deve ter seu tamanho reduzido e estabilizar em alguns décimos de nanômetros, pois as APCs internalizam mais facilmente partículas até 500 nm, gerando uma resposta humoral e imunidade mediada por células T (LINCOPAN, 2009). Além disso, na preparação da formulação vacinal, busca-se a obtenção de partículas com carga final positiva. Este lípide catiônico é, então, capaz de entregar o antígeno para as células por contato imediato com a superfície destas, via interação eletrostática, seguida por internalização, sendo assim um excelente imunoadjuvante (LINCOPAN, 2009).

DDA-BF exibe boa estabilidade coloidal quando complexada com antígenos, com completa ausência de toxicidade em camundongos e uma indução notável de resposta imune do tipo Th1 observado em doses reduzidas do lipídio (CARMONA-RIBEIRO, 2010).

DDA-BF já foi estudado com diferentes antígenos como: soro contendo albumina bovina, antígeno purificado 18 kDa/14kDa de *Taenia crassiceps* e a proteína recombinante 18 kDa-hsp de *Mycobacterium leprae*, para comprovar sua atividade imunoadjuvante in vivo em comparação a outros adjuvantes (LINCOPAN, 2009).

DDA também foi investigado em formulações farmacêuticas, como no caso da anfotericina B (AMB), utilizada em tratamentos para infecções fúngicas e para parasitoses intracelulares como as causadas para *Leishmania.* O efeito tóxico causado pela droga levou a estudos onde a AMB foi complexada ao DDA, e testada em camundongos, demonstrando excelente atividade in vivo e baixa neurotoxicidade nestes animais (LINCOPAN, 2007).

Sabe –se que *Nesseria lactamica* é uma espécie comensal não patogênica que coloniza mais frequentemente crianças do que adultos, sendo estimado que 59% das crianças a possuem na nasofaringe durante os quatro primeiros anos de vida. A explicação para isso é que este tipo de *Neisseria* tem a habilidade de usar a lactose, e crianças nesta faixa etária tendem a ingerir maiores quantidades de leite, contribuindo para o aumento da população desta cepa. Provavelmente crianças pequenas que portam bactérias comensais como *N. lactamica* na nasofaringe, podem adquirir imunidade à *N. meningitidis* através de repetidas exposições aos antígenos de reatividade cruzada presentes entre estas bactérias (MORLEY; POLLARD, 2002). Deste modo, portadores de *N. lactamica* podem estar mais protegidos contra a DM (POLLARD; FRASCH, 2001).

Assim, recentemente em nosso laboratório, o DDA-BF foi testado junto à OMVs de *Neisseria lactamica*, com a finalidade de se identificar uma preparação imunogênica contra *N. meningitidis* B, baseada nos antígenos de reatividade cruzada, demonstrando resultados promissores (GASPAR et al., 2013).

Trata-se de uma das vias para se obter uma vacina para o meningococo B, já que *N. lactamica* não possui cápsula nem PorA e compartilha muitos antígenos

cruzados com o meningococo. Uma substancial proporção de anticorpos no soro de pacientes com DM pode ser adsorvido pela proteína de membrana externa de *N. lactamica*. O uso de vacinas baseadas em OMVs de *N. lactamica* pode oferecer uma potencial proteção contra a D.M.

Para testar a eficácia da preparação antigênica do estudo realizado em nosso laboratório com *N. lactamica*, testes de imunogenicidade foram realizados em camundongos, sendo que apenas uma dose da preparação antigênica foi suficiente para a ocorrência de HTT, enquanto que ao mesmo só ocorreu após duas doses da preparação antigênica que utilizava o hidróxido de alumínio como adjuvante. O complexo DDA-BF e OMVs de *N. lactamica* promoveu a produção de anticorpos IgG com avidez intermediária em apenas uma dose, sugerindo que esta preparação antigênica possui um grande potencial para ser usada como vacina no futuro contra o meningococo B (GASPAR et al., 2013). No nosso estudo, complexamos DDA-BF à OMVs de *N.meningitidis* B para estudar o efeito imunoadjuvante desta preparação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a resposta imune humoral e celular promovida pela imunização de camundongos fêmeas, não isogênicos, com OMVs de *N. meningitidis* B associada a brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA-BF) ou hidróxido de alumínio como adjuvantes.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar a produção de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b presentes nos soros de camundongos previamente imunizados por via subcutânea, com DDA-BF e Hidróxido de Alumínio complexados à OMVs de *N. meningitidis* B; por ELISA, com 15 dias (IgG total) e 60 dias (IgG e isótipos) após a imunização;
- Determinar a avidez dos anticorpos após 60 dias de imunização;
- Avaliar a reação de hipersensibilidade tardia (HTT) nos grupos previamente imunizados e dos grupos controle, dos quais foram desafiados com a injeção da cepa homóloga B:4:P1.9;
- Estudar a reatividade cruzada através de *westernblotting* e Dot-ELISA, com soros de pacientes que apresentaram a doença meningocócica em 2011 e 2012.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de bactérias

As cepas de bactérias de *N. meningitids* B:4:P1.9, B:4:P1.15 e *N. lactamica*, utilizadas neste experimento, foram obtidas pelo núcleo de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz Centra (IAL), na Coleção de Microorganismos, das quais foram isoladas do líquor e sangue de pacientes que apresentaram a doença meningocócica. O motivo de escolha das cepas foi devido à prevalência destas no Brasil. A cepa encontrava-se liofilizada, e foi reativada em ágar-chocolate, base Muler Hinton. Partindo-se deste crescimento, as cepas de *N. meningitidis* foram semeadas em placas de Petri descartáveis com 15 cm de diâmetro (Costar, Cambridge, MA, EUA), contendo ágar-soro preparado com base de ágar-soja e tripcaseína (Difco Laboratories Detroit, MI, EUA) enriquecido com 1% de soro de cavalo (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 (Forma Scientific, Detroit, Mi, EUA) por aproximadamente 24 horas.

3.2 Obtenção das vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis*

As vesículas de membrana externa (OMVs) foram extraídos da cepa B:4:P1.9, do Instituto Adolfo Lutz. A bactéria foi cultivada em três placas de Petri, contendo ágar soja e tripcaseína (TSA, do inglês *trypticase soy agar*) enriquecido com soro de cavalo a uma concentração final de 1%, e mantidas a 37 °C.

Após 24 horas de crescimento, as células foram coletadas com auxílio de um bastão em forma de L, e transferidas para um balão de 200 mL de volume contendo caldo triptona (TSB – DIFCO™). O meio inoculado foi incubado a 37 °C por um período de 6 a 8 horas, sob agitação de 120 rpm. A partir deste pré-inóculo foram repicados 50 mL de cultura em um balão com 500 mL de TSB e novamente inoculados sob as

mesmas condições citadas anteriormente. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 10.000 x g a 4 °C por 15 minutos.

O sedimento foi ressuspenso em solução preparada de Tris 10 mM (pH 8.0), contendo 0,1 % de inibidor de protease (10 mM PMSF em isopropanol – Sigma®) e inativado em banho-maria a 56 °C. A suspensão foi centrifugada a 10.000 X g, a 4 ^{o}C, por 10 minutos, em seguida ressuspendidas em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,8), com cloreto de lítio estéril 0,2 M. A preparação foi incubada sob agitação, durante duas horas a 45 ^{o}C e em seguida, novamente centrifugado a 12.000 X g por 20 minutos a 4 ºC (FRASH et al., 1985) compérolas de vidro para estimular a liberação das OMVs. O sobrenadante, que corresponde ao antígeno OMVS, foi retirado e dialisado, contra NaCl 0,15 M a 4 ^{o}C, “overnight”.

3.3 Dosagem de proteínas das vesículas de membrana externa de *N. meningitidis*

Foi utilizado método por automação do aparelho Nanodrop 3300 (Thermo Scientific) que consiste em um fluoroespectrômetro, no qual amostras de 1 µL de OMVs de *N. meningitidis* ressuspendidas em PBS foram pipetadas diretamente na superfície de medida e mantidas no local pela tensão superficial (COSTA–SILVA et al., 2012). Para o Branco do aparelho foi utilizada água MiliQ.

3.4 Caracterização de antígenos de *N. meningitidis* por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* foram avaliados e caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), a 13%, seguindo protocolo estabelecido por LAEMMILI et al. (1970). Amostras foram preparadas contendo 50 µL de vesícula de membrana externa de meningococo (cepa B:4.P1.9), 50 µL de tampão e 10 µL de azul de bromofenol, e foram aquecidas a 100°C em bloco térmico por dez minutos. Cerca de 50 µL de amostras foram aplicadas no gel, correram com voltagem constante de 120 Volts, junto a tampão de corrida eletroforética (TUNES et al., 2006).

Aplicamos em local específico do gel um padrão de proteínas com pesos moleculares conhecidos (Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, New Jersey, EUA), em que destacamos: fosforilase b (94 kDa); albumina bovina (67 kDa); ovoalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa) e alfa-lactoalbumina (14 kDa). Os pesos moleculares (P.M.) das bandas foram determinados a partir da reação linear entre o log do P.M. e migração relativa (R.F.) de proteínas padrão.

3.5 Coloração por azul de *Coomassie*

O corante *Coomassie Blue* (Coomassie Phast Blue – R250, Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, New Jersey, EUA) foi adicionado ao gel para a caracterização proteica dos componentes de membrana externa de *N. meningitidis* B. O gel permaneceu nesta solução corante por aproximadamente uma hora em estufa com temperatura de 56 °C, e então descorado por solução de ácido acético glacial a 7%, trocado sucessivamente até a melhor visualização das bandas protéicas (TUNES et al., 2006).

3.6 Preparação dos lípides catiônicos DDA-BF

Foi preparada uma solução estoque de DDA 2 mM em NaCl 1 mM. Foram utilizados estes valores pois esta quantidade de DDA e NaCl equivale à concentração estoque de 2 mM do adjuvante. Esta solução foi sonicada em macrotip de titânio a 25% a 15 minutos, para obtenção dos fragmentos de bicamada de DDA (DDA-BF). Posteriormente a solução foi centrifugada (1h x 14,000 rpm, 4 °C) para remoção de partículas de titânio (SCHALES; SCHALES, 1941).

3.7 Preparação dos complexos antigênicos DDA-BF/OMVs e hidróxido de alumínio/OMVs

3.7.1 Preparação das dispersões lipídicas Fragmentos de bicamada de DDA (DDA-BF) (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), foram preparados por sonicação com macrotip de titânio em NaCl 1 mM na concentração final de 2,0 mM de DDA, com posterior centrifugação (1 h x 14,000 rpm, 4 °C) para remoção de partículas de titânio (SCHALES & SCHALES, 1941).

3.7.2 Preparação do complexo DDA-BF/OMVs

Para estudar a interação entre OMVS e DDA-BF, a concentração de DDA foi fixada em 0,1 mM (diluído a partir da solução estoque 2mM) e a solução estoque de OMVS (1345 µg de proteína/mL) foi diluída para a obtenção de complexos de DDA-BF/OMVs com e concentrações de proteína de variáveis: 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/mL. A preparação DDA-BF/OMVs foi diluída em NaCl 1 mM). Este procedimento visa escolher a maior concentração proteica que, adsorvida ao DDA-BF, produza uma dispersão coloidal com carga final positiva e tamanho médio das partículas inferior a 500 nm.

3.7.3 Determinação do diâmetro médio (Dz), distribuição de tamanhos, polidispersidade, e potencial zeta (ζ) nos fragmentos de bicamada e da sua associação com OMVS de Neisseria meningitidis

A distribuição de tamanhos, diâmetro médio (*Dz*), a polidispersidade, e o potencial zeta (ζ) de DDA-BF, OMVs, e sua associação, foram determinadas usando o ZetaPlus-Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY), equipado com um laser de 677 nm e *dynamic light-scattering* (*PCS*) a 90º para a medição de tamanhos .

3.7.4 Preparo dos complexos DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs

Após a realização dos testes descritos no ítem 3.7.3, determinou-se que a máxima concentração de proteína para a formação de complexos com carga positiva e diâmetro médio menor que 500 nm era da 15 µg/mL, com DDA-BF 0,1 mM em NaCl 1 mM. Estes complexos foram usados para imunizar os animais. Para a preparação do antígeno H.A.**/**OMVs, 1mg/mL de H.A. e 15 µg/mL de OMVS também foram diluídos em NaCl 1 mM. Cada animal recebeu 100 µL de antígeno, sendo imunizado, portanto, com 2 µg de antígeno.

3.8 Animais usados no estudo

Foram utilizados camundongos fêmeas não isogênicos, de 6 a 8 semanas de idade, criados e mantidos pelo biotério do IAL, unidade central, em São Paulo. Os requisitos do código de ética para a pesquisa em animais foram seguidos durante a experimentação, após análise e aprovação do projeto, com número do comitê de ética aprovado CEUA-IAL/Pasteur n°.06/2012. Os camundongos foram separados por grupos e receberam as preparações antigênicas por injeção subcutânea, no abdômen, em dois sítios. Dez camundongos foram avaliados em cada grupo experimental, divididos em experimentos realizados em duplicata .

3.9 Desenho experimental

Os animais do grupo 1 foram imunizados com DDA-BF como adjuvante complexado à vesículas de membrana externa (OMVs) de *N. meningitidis* B da cepa B:4:P1.9; no grupo 2 utilizou-se hidróxido de alumínio (H.A.) como adjuvante complexado à mesma quantidade de vesículas (OMVs) de *N. meningitidis* B. As quantidades de adjuvante e vesícula de membrana externa foram citadas no item 3.7.4. Animais dos grupos 3, 4 e 5, foram usados como controle, sendo respectivamente, imunizados com: vesícula de membrana externa (OMVs), DDA-BF e H.A. Foram colhidos os soros pré-imunes dos grupos imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs.

Os soros dos animais dos grupos controle 3, 4 e 5 foram colhidos após 15 dias de imunização. O esquema pode ser observado de modo simplificado na tabela 3.

Tabela 3 - Esquema de imunização dos animais com OMVs de *N. meningitidis* complexados ao DDA-BF ou hidróxido de alumínio.

GRUPO	Número de animais	OMVS µg/mL	DDA-BF mM	Al(OH)3 mg/mL	Número de Imunizações
1	15	2 µg	0,1 mM	-	2
2	15	2 µg	-	0,1 mg/ml	2
3	5	2 µg	-	-	2
4	8	-	0,1 mM	-	2
5	9	-		0,1 mg/ml	2

Temos que: OMVs= vesículas de membrana externa; DDA-BF= brometo de dioctadecildimetilamonium; Al(OH)3 = hidróxido de alumínio (H.A.)

Foram realizados dois experimentos independentes. A tabela já consta com o número total de camundongos imunizados no estudo.

3.10 Esquema utilizado na imunização, coleta e desafio dos camundongos

Os animais foram separados por grupos conforme a preparação antigênica a ser recebida, e colocados em gaiolas identificadas. O sangue pré-imune foi coletado antes que se iniciassem as imunizações. Após estes procedimentos, o esquema de doses deu-se da seguinte forma: no dia 0, os animais receberam as preparações antigênicas; após quatorze dias, foi feito o desafio com a cepa homóloga B:4:P1.9 nas patas direitas de alguns animais de cada grupo, para verificação de inflamação local conhecida por hipersensibilidade tardia, onde as patas foram medidas por paquímetro e seu diâmetro verificado. No 15° dia, os animais restantes, que não participaram do desafio, foram sangrados para análise do soro após 15 dias de imunização e submetidos à segunda

dose das preparações antigênicas. Após 45 dias, nova coleta foi realizada para a análise dos soros, totalizando, 60 dias após a primeira imunização.

3.11 Avaliação da reatividade cruzada e específica dos anticorpos IgG produzidos nas imunizações por *Immunoblot*

Esta técnica foi utilizada para demonstrar a especificidade e a reatividade cruzada dos anticorpos produzidos pela imunização dos camundongos em relação à cepa homóloga e à cepa vacinal B:4.P1.15.

O gel de poliacrilamida foi transferido para uma membrana de nitrocelulose 0,2 µc, do mesmo tamanho do gel, e junto a esta membrana, foi feito um sanduíche com folhas de papel filtro de várias espessuras para que a transferência das proteínas fosse garantida. Esta sequência, de papel filtro, membrana, gel e papel filtro foi colocada em cuba de transferência eletroforética contendo tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192 mM, metanol 20% pH 8.3). Os peptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos do gel para a membrana de nitrocelulose por um período de 18 horas, em voltagem constante de 17 V. No dia seguinte, as membranas recém - transferidas foram retiradas da cuba e coradas com Ponceau-S (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um corante reversível, para controle da transferência. Depois foram lavadas com água destilada abundantemente e secas em papel filtro. As membranas foram cortadas em tiras e colocadas em recipientes separados para ser analisadas. Assim, cada tira seria analisada com uma amostra de soro individual de camundongo imunizado.

Em seguida, as tiras foram lavadas com PBS sem *tween*, pH 7,4,para então se efetuar o bloqueio com leite desnatado (MOLICO, Nestlé) a 5% diluído em PBS sem tween, permanecendo por período *overnight*, em geladeira. Lavou-se novamente com PBS após o bloqueio e incubou-se por 18 horas com os soros obtidos dos animais imunizados, na diluição de 1:50. No dia seguinte, as membranas foram lavadas cinco vezes com PBS sem *tween*, onde adicionou-se conjugado específico anti-IgG (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), na proporção 1:1000 e incubadas por duas horas.

Seguiu-se de sucessivas lavagens, até a revelação com 670 µl de AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) à 4%, 10 ml de acetato de sódio pH 5,0 e 10 µl de água oxigenada (H_2O_2). A reação enzimática foi interrompida com água MiliQ após 20 minutos. As fitas foram secas e coladas em papel sulfite para avaliação das proteínas reconhecidas pelos soros testados.

3.12 ELISA para avaliação de anticorpos IgG nos soros colhidos individualmente, após uma e duas doses de imunização

O teste de ELISA foi realizado para avaliação de anticorpos IgG nos soros de 15 e 60 dias após a imunização individualmente, e foi baseado na técnica de Abdillahi & Poolman, 1988. Do mesmo modo, também foi realizado ELISA para análise de avidez dos anticorpos e isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b, com algumas modificações.

Placas de microtitulação de fundo chato (Maxisorb, Nunc), contendo 96 poços, foram sensibilizadas com 28,2 µl de vesículas de membrana externa da cepa B:4.P1.9 de meningococo, mortas com azida sódica a 0,02%, em 11 ml de tampão carbonato bicarbonato, com 100 µl por poço. Mantidas em geladeira, dentro de câmara úmida, as placas foram sensibilizadas por período de 18 horas.

Depois, as placas foram lavadas com PBS *tween* 0,05% e bloqueadas com 200 µl por cavidade de leite desnatado (MOLICO, Nestlé) a 5% por duas horas a 37 °C. Novamente, foram lavadas com PBS tween a 0,05% e as amostras de soros foram adicionadas, seguindo a diluição de 1:100, na razão 2, e adicionada num volume de 100 µL por cavidade. A diluição do soro foi feita em leite desnatado a 2,5%. A placa foi incubada a 37°C por período de duas horas.

Em seguida, as placas foram lavadas com PBS tween 0,05% e foi adicionado 100 µL por cavidade do conjugado anti-mouse IgG (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), diluídos em leite desnatado a 2,5 % na proporção de 1:2000, e incubadas a 37 ºC por duas horas.

Respeitado este tempo, as placas foram lavadas e reveladas com 250 µL de TMB, 12,5 mL de tampão citrato bicarbonato e 13 µL de água oxigenada a 30%, num volume de 100 µL por cavidade, e mantida em estufa a 37 ºC por 15 minutos. O ácido sulfúrico 4N

foi adicionado posteriormente em 100 µL por cavidade para interromper a reação enzimática. As densidades ópticas foram analisadas espectrofotômetro, Multskan MS (Labsystems) a 450 nm. Foram consideradas positivas as amostras com leitura das absorbâncias (DO) maiores que os títulos mais altos apresentados pelos soros pré – imunes. Os limiares de reatividade foram determinados para cada camundongo para a detecção de anticorpos da classe IgG induzidos pela via subcutânea, com o intuito de se obter a máxima descrição de reatividade com OMVs de *N. meningitidis* utilizados neste estudo. Os *cut offs* foram calculados como sendo a média mais três desvios padrão da absorbância dos controles pré-imunes. Para os soros imunes, a reatividade foi considerada para todos os valores acima desse limiar de reatividade.

3.13 ELISA para determinação do índice de avidez dos anticorpos após duas doses de imunização

O índice de avidez (IA) dos anticorpos do isótipo IgG produzidos contra OMVs de *N. meningitidis* B foi realizado com soro colhido após sessenta dias da primeira imunização. A metodologia utilizada foi descrita por GRANOFF et al., 1998. O procedimento foi praticamente igual ao descrito no item 3.11 do ELISA, com a adição de tiocianato de potássio (KSCN) 1,5 M, agente caotrópico, que foi colocado em 100 µl por poço antes da etapa onde se adiciona anti-mouse IgG. Deixamos a placa com tiocianato de potássio por 20 minutos em temperatura ambiente. As etapas seguintes foram: lavagem, adição de conjugado anti-mouse IgG, incubação, lavagem e revelação, assim como descrito anteriormente.

O IA foi determinado de acordo com VERMONT et al. (2002). Nos ensaios os soros – teste foram incubados na ausência e na presença de KSCN. A avaliação da avidez deu-se por densidade óptica a 450 nm. O índice de avidez foi expresso como a razão/média das absorbâncias na presença de KSCN/ média das absorbâncias na ausência de KSCN (com PBS) (CHACKERIAN et al., 2001).

Quadro 2 - Avaliação dos Índices de Avidez para anticorpos IgG presentes no soro de acordo com Chackerian et al., 2001

Índices de Avidez	Interpretação
Acima de 0,5	Alta avidez
Entre 0,3 e 0,49	Avidez intermediária
Abaixo de 0,29	Baixa avidez

3.14 ELISA para avaliação de isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b após duas doses de imunização

Para a realização das análises de ELISA para avaliação de isótipo IgG1, IgG2a e IgG2b, o mesmo protocolo descrito no item 3.11 foi seguido, mudando apenas os conjugados que foram adicionados nas placas na proporção de 1:2000, com a especificidade do isótipo que se desejava testar. Foi usado o sistema avidina biotina pra determinação de anticorpos IgG1, que foi adicionado antes do conjugado anti-IgG1, na proporção de 1:1000.

3.15 Avaliação da Hipersensibilidade Tardia (HTT) após uma dose de imunização

O teste de hipersensibilidade tardia foi realizado no 14° dia após os animais receberem a primeira dose das preparações antigênicas. Para isso, a pata direita foi usada como controle, e não recebeu o desafio, enquanto que a esquerda, recebeu no coxim plantar, uma injeção de OMVs da cepa homóloga B:4.P1.9 com cerca de 5 µl de volume total, contendo 2 µg de proteína. Após 24 horas, as patas foram medidas por paquímetro para verificar se o processo inflamatório ocorreu, demonstrando inchaço típico, analisado no HTT. Os diâmetros das patas foram medidos e seus valores foram comparados entre os grupos e com as patas controle.

3.16 Avaliação a antígenos de reatividade cruzada com cepas meningocócicas isoladas de pacientes nos anos de 2011/2012 através de DOT – ELISA

Para realização do Dot-ELISA, 1 µL de cada uma das cepas prevalentes isoladas de pacientes como descrito em (LEMOS et al 2001) e que apresentaram a DM nos anos de 2011 e 2012 de *N. meningitidis* foram aplicadas em uma membrana de nitrocelulose 0,2 µc (BioRad-300). Foram feitas três membranas com a mesma sequência de cepas aplicadas. Após a secagem em temperatura ambiente, as membranas foram imersas em 5 ml de leite desnatado (La Sereníssima) a 5% diluído em PBS sem tween, previamente fervido. As membranas permaneceram em bloqueio por 15 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS sem tween e os soros foram adicionados em forma de *pool* na diluição 1: 100. , em leite desnatado a 2,5 %.

3.17 Análise estatística

A significância dos resultados foi avaliada pelo método ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

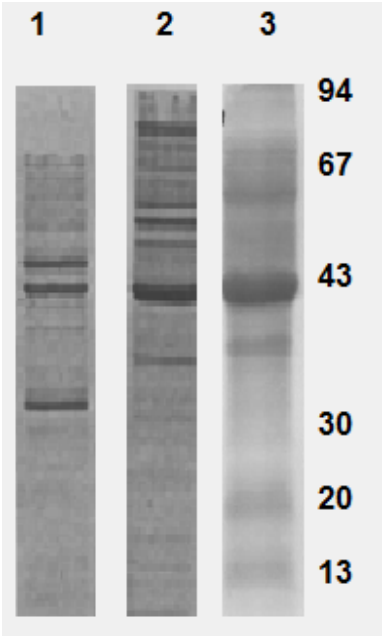
4 RESULTADOS

Este estudo foi realizado com camundongos não isogênicos, fêmeas, com 6-8 semanas de idade, imunizados com vesículas de membrana externa (OMVs) de *N. meningitidis* B (cepa B:4:P1.9), complexados a dois diferente adjuvantes, fragmentos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamôio (DDA-BF) e hidróxido de alumínio (H.A.). Os animais foram imunizados duas vezes, com intervalo de 15 dias e os soros foram colhidos 15 e 60 dias após a primeira imunização. Os animais foram separados em grupos experimentais, imunizados de acordo com a tabela 3. A avaliação da HTT foi realizada pela mensuração do inchaço nas patas provocado pelo desavio com OMVS de cepa homóloga, 14 dias após a primeira imunização. Os animais que participaram do desafio com as OMVs da cepa homóloga para o HTT não mais participaram do esquema de imunizações, pois a injeção das OMVs no coxim plantar pode ser considerado um reforço de imunização. Avaliamos a resposta imune humoral pela quantificação de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b por ELISA e as reatividades específica e cruzadas por *Immunoblot*. Realizamos o DOT-ELISA para verificar se o *pool* de soros reconheceria antígenos de reatividade cruzada com as cepas isoladas de pacientes nos anos de 2011/2012. A seguir, os resultados foram descritos detalhadamente.

4.1 Caracterização dos antígenos de *Neisseria meningitidis* por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e corado por azul de *Coomassie*

As OMVs de *N. meningitidis* B:4:P1.9 (usada na imunização), B:4:P1.15 e *N. lactamica* foram caracterizadas por separação eletroforética das proteínas em gel SDS-PAGE a 13% e coloração por azul de *Coomassie* para verificar o perfil de migração das mesmas. Foi observado que as cepas apresentavam antígenos na faixa de 8 a 130 kDa. As cepas analisadas apresentaram um padrão heterogêneo após coloração. Alguns antígenos aparecem de modo predominante nas cepas.

Figura 7 – Perfil eletroforético das OMVs de *N. meningitidis* e *N. lactamica* por SDS-PAGE.



1 - OMVs da cepa homóloga de *N. meningitidis* B:4:P1.9; 2 – OMVS da cepa heteróloga de *N. meningitidis* B B:4:P1.15; 3 – OMVS da cepa comensal *N. lactamica*;

4.2 Tabela de imunização dos camundongos

Para obtenção dos soros dos animais imunizados foi seguido um esquema de imunização conforme já descrito no item 3.10 e esquematizado na tabela 4. A injeção das preparações antigênicas foi realizada no abdômen dos camundongos, por via subcutânea, em dois locais. Os animais receberam as imunizações preparadas conforme descrito no item 3.9.

Tabela 4 - Esquema utilizado para imunização e coleta de sangue dos animais, assim como avaliação do HTT

Dia 0	Coleta de sangue pré-imune e primeira dose de imunização.
Dia 14	Animais separados para o desafio com OMVS de cepa homóloga, nas patas, para mensuração do HTT.
Dia 15	Mensuração do inchaço provocado pela HTT dos animais que receberam o desafio; Coleta de sangue imunizado; e segunda dose de imunização.
Dia 60	Coleta de sangue após duas doses das preparações antigênicas.

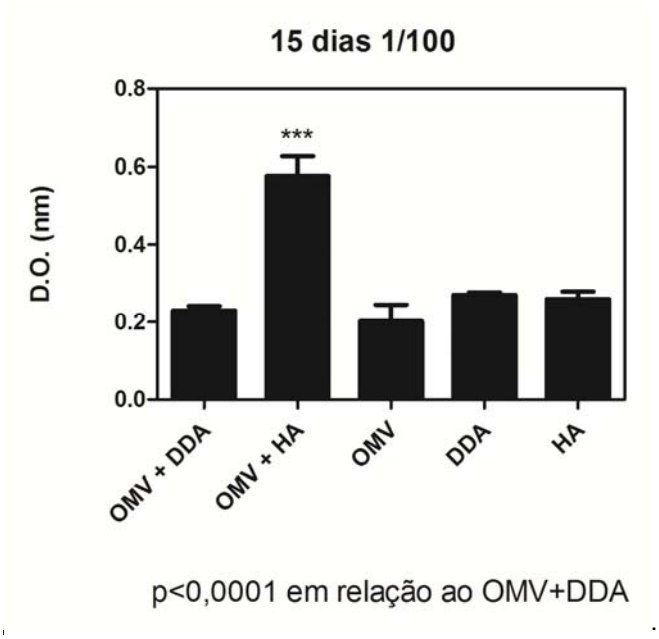
Os soros dos camundongos foram obtidos por sangria no plexo oftálmico, seguindo os critérios estabelecidos pela ética em pesquisa com animais. O sangue foi centrifugado e o soro separado e aliquotado em tubos de microcentrífuga identificados, conservados a -20 °C.

4.3 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presente nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas (após 15 dias de imunização), por ELISA

A produção IgG nos camundongos, induzida após uma dose de imunização foi avaliada por ELISA, em placas cobertas com antígenos de cepa homóloga, 15 dias após a primeira imunização. Os grupos de imunização podem ser vizualizados na tabela 3 do item 3.9.

Como se observa na figura 8, o índice de anticorpos IgG produzidos pelo grupo imunizado com H.A./OMVs foi maior do que o índice de anticorpos produzido pelo grupo imunizado com DDA-BF/OMVs ($p<0,0001$). Na verdade, no grupo imunizado com DDA-BF/OMVs não houve produção significativa de IgG, 15 dias após a primeira imunização.

Figura 8 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG produzidos no soro de camundongos imunizados após uma dose.

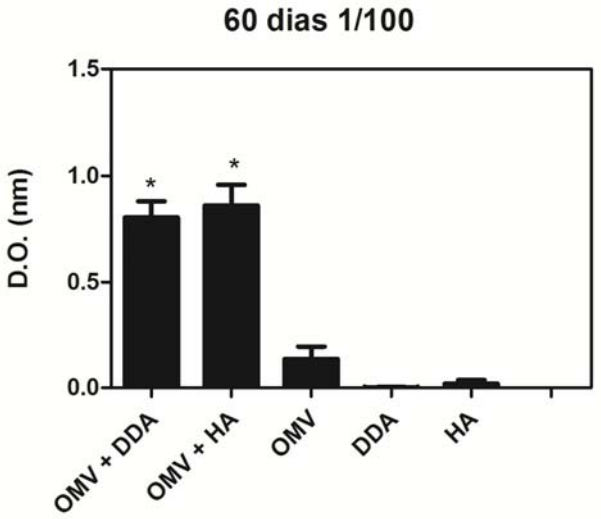


Legenda: Produção de IgG, no soro de camundongos imunizados com uma dose de antígeno, 15 dias após a primeira imunização, por ELISA. A avalialiação na produção de anticorpos foi realizada por ELISA. As placas foram adsorvidas com antígenos de cepa homóloga. Os resultados representam os soros diluídos 1:100. OMVS+DDA = soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS+HA = soro dos animais imunizados com H.A./OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS = soros controle de camundongos imunizados apenas com OMVs de *N. meningitidis* B:4:P1.9; DDA = soros controle de camundongos imunizados apenas com DDA-BF; HA = soros controle de camundongos imunizados apenas com hidróxido de alumínio. Barras representam o erro médio. *** p<0,0001.
Os soros foram analisados individualmente, em triplicata.

4.4 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA

Na figura 9 é possível concluir que não houve diferenças significativas nos títulos de anticorpos IgG produzidos 60 dias após a imunização, nos dois grupos experimentais, imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, depois de receberem duas doses das preparações antigênicas.

Figura 9 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG produzidos no soro de camundongos imunizados após 2 doses.



p<0,05 em relação aos controles

Legenda:.Produção de IgG, no soro de camundongos imunizados com duas doses de antígeno, 60 dias após a primeira imunização. A avalialiação na produção de anticorpos foi realizada por ELISA. As placas foram adsorvidas com antígenos de cepa homóloga. Os resultados representam os soros diluídos 1:100. OMVS+DDA = soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS+HA = soro dos animais imunizados com H.A./OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS = soros controle de camundongos imunizados apenas com OMVs de *N. meningitidis* B:4:P1.9; DDA = soros controle de camundongos imunizados apenas com DDA-BF; HA = soros controle de camundongos imunizados apenas com hidróxido de alumínio. Barras representam o erro médio. * p<0,05.
Os soros foram analisados individualmente, em triplicata.

4.5 Determinação do índice de avidez (IA) dos anticorpos produzidos após duas doses de imunização

A determinação de dos títulos de anticorpos por meio de ELISA não nos oferece nenhuma informação sobre a funcionalidade dos anticorpos presentes no soro. No entanto, em um ensaio de ELISA modificado, utilizando-se substâncias caotrópicas como o tiocianato de potássio, é possível determinar a eluição de anticorpos IgG com ligações fracas, enquanto que as ligações de alta força molecular são mantidas, concluindo se os anticorpos gerados na imunização são de baixa, intermediária ou alta avidez (CHACKERIAN et al., 2001).

De acordo com a classificação descrita por Chakerian et al. (2001) - segundo os resultados descritos na tabela 5, os anticorpos de classe IgG produzidos após 60 dias da primeira imunização e após segunda dose, foram de intermediária e alta avidez, independente do adjuvante utilizado nas preparações antigênicas. O índice de avidez em soros *pool* do grupo DDA-BF/OMVs se apresentou com avidez intermediária, enquanto que o soro pool do grupo imunizado com H.A./OMVs se apresentou com avidez intermediária ou alta.

Tabela 5 – Índice de avidez (IA) dos anticorpos IgG presentes no soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, 60 dias após a primeira imunização.

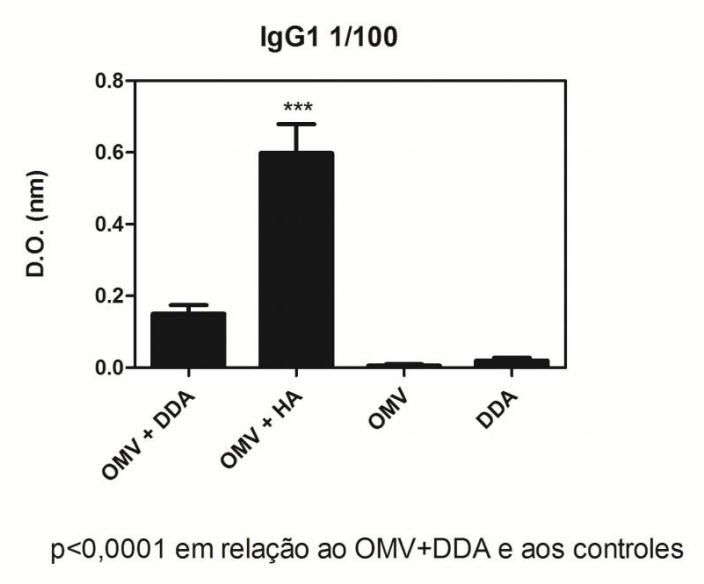
AMOSTRA	Índice de Avidez (IA)	Classificação
Soros *pool* H.A./OMVs	0,55	Alta
S.I.* H.A./OMVs	0,54	Alta
S.I.* H.A./OMVs	0,63	Alta
S.I.* H.A./OMVs	0,58	Alta
S.I.* H.A./OMVs	0,49	Intermediária
Soros *pool* DDA-BF/OMVs	0,47	Intermediária
S.I.* DDA-BF/OMVs	0,45	Intermediária
S.I.* DDA-BF/OMVs	0,4	Intermediária
S.I.* DDA-BF/OMVs	0,43	Intermediária
S.I.* DDA-BF/OMVs	0,65	Alta

S.I.*= soro de individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs

4.6 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG1 presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA

O isótipo IgG1 também foi avaliado por ELISA. Foi possível verificar que as duas imunizações, foram capazes de gerar resposta do tipo Th2. Como se observa na figura 10, a quantidade de anticorpos IgG1 produzidos no grupo de camundongos imunizados com H.A./OMVs foi significativamente maior ($p<0,0001$) nos animais imunizados com DDA-BF/OMVs.

Figura 10 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG1 presentes no soro de camundongos imunizados após duas doses.

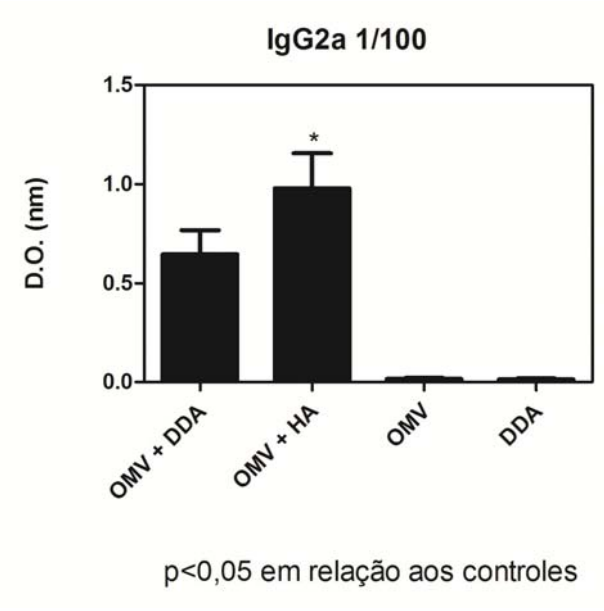


Legenda: Produção de IgG1, no soro de camundongos imunizados com uma dose de antígeno, 60 dias após a primeira imunização. A avalialiação na produção de anticorpos foi realizada por ELISA. As placas foram adsorvidas com antígenos de cepa homóloga. Os resultados representam os soros diluídos 1:100. OMVS+DDA = soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS+HA = soro dos animais imunizados com H.A./OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS = soros controle de camundongos imunizados apenas com OMVs de *N. meningitidis* B:4:P1.9; DDA = soros controle de camundongos imunizados apenas com DDA-BF. Barras representam o erro médio. *** p<0,0001.
Os soros foram analisados individualmente, em triplicata.

4.7 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG2a presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA

A produção de IgG2a foi maior em camundongos que receberam por via subcutânea a preparação antigênica com H.A/OMVs do que nos controles (p<0,05). Porém, não houve diferença significativa na produção deste isotipo entre os grupos imunizados com H.A/OMVs e DDA-BF/OMVs (figura 11).

Figura 11 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG2a presentes nos soros de camundongos imunizados após duas doses.

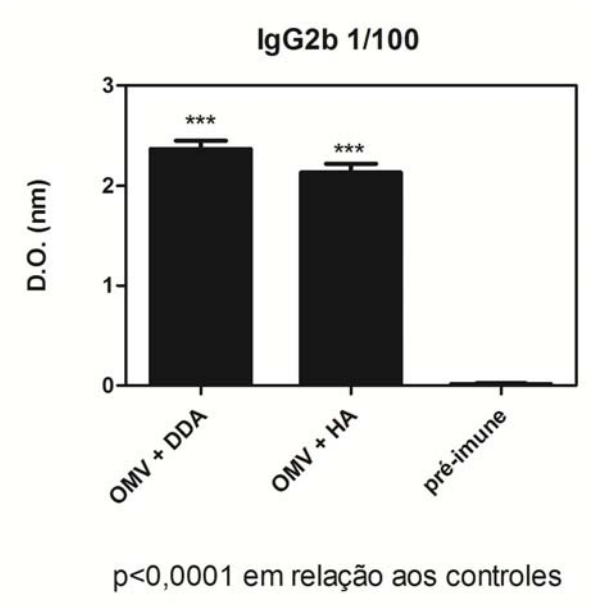


Legenda: Produção de IgG2a, no soro de camundongos imunizados com uma dose de antígeno, 60 dias após a primeira imunização. A avalialiação na produção de anticorpos foi realizada por ELISA. As placas foram adsorvidas com antígenos de cepa homóloga. Os resultados representam os soros diluídos 1:100. OMVS+DDA = soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS+HA = soro dos animais imunizados com H.A./OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS = soros controle de camundongos imunizados apenas com OMVs de *N. meningitidis* B:4:P1.9; DDA = soros controle de camundongos imunizados apenas com DDA-BF. * p<0,05.
Os soros foram analisados individualmente, em triplicata.

4.8 Reatividade de anticorpos do isótipo IgG2b presente nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas (após 60 dias da primeira imunização), por ELISA

Os soros utilizados nesta análise foram colhidos após a segunda dose (60 dias) de imunização. Os títulos dos anticorpos do isótipo IgG2b produzidos não tiveram diferenças significativas entre os grupos experimentais, independente do adjuvante a ser utilizado. Porém, para os dois grupos a produção de anticorpos foi significativamente maior que do controle pré-imune (p<0,0001)

Figura 12 – ELISA para avaliação do título de anticorpos IgG2b presentes nos soros de camundongos imunizados após duas doses.



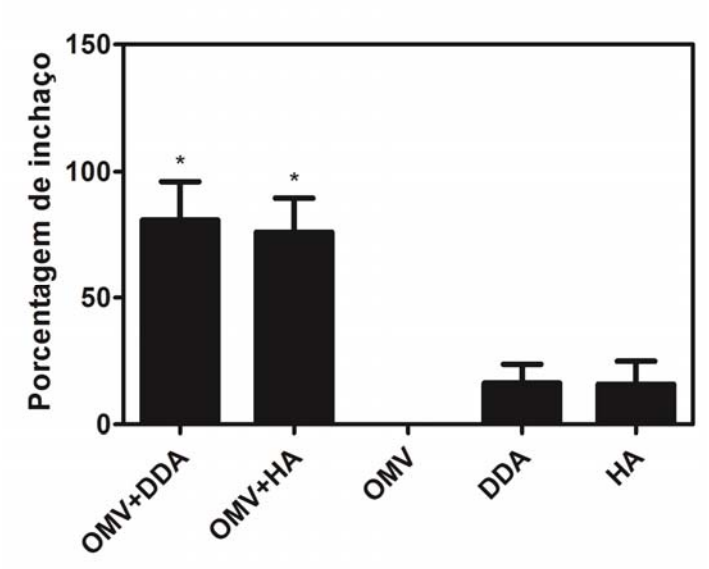
Legenda: Produção de IgG2b, no soro de camundongos imunizados com uma dose de antígeno, 60 dias após a primeira imunização. A avaliação na produção de anticorpos foi realizada por ELISA. As placas foram adsorvidas com antígenos de cepa homóloga. Os resultados representam os soros diluídos 1:100. OMVS+DDA = soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS+HA = soro dos animais imunizados com H.A./OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; Pré-imune = soros controle de camundongos antes das imunizações. Barras representam o erro médio. * p<0,05. Os soros foram analisados individualmente, em triplicata.

4.9 Avaliação da hipersensibilidade tardia (HTT) nos camundongos após a primeira dose de imunização

A hipersensibilidade tardia (HTT) é um importante parâmetro para avaliação da imunidade celular induzida pela imunização efetiva (HILGERS & SNIPPE, 1992). Como previamente descrito no item 3.15, oito animais de cada grupo foram separados para que recebessem o desafio na pata esquerda traseira, 14 dias após a primeira imunização. O volume utilizado foi de 200 µL, contendo 2 µg de proteína de OMVS da cepa homóloga B:4:P1.9. A leitura foi feita após 24 horas e as patas foram medidas por paquímetro. Nos dois grupos experimentais o inchaço das patas foi significativamente

superior aos dos controles, sugerindo que apenas uma dose foi suficiente para estimular a proliferação de linfócitos efetores. Não houve, entretanto, diferença entre os animais imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, indicando que a resposta celular, neste caso, é independente do adjuvante utilizado. Nos grupos controle o pequeno inchaço que ocorreu provavelmente foi consequência da resposta inflamatória inespecífica provocada pela injeção, que causa dano físico no tecido local.

Figura 13 - Porcentagem de inchaço das patas dos animais desafiados com 2 µg de OMVs de *N. meningitidis* após 24 horas do desafio.



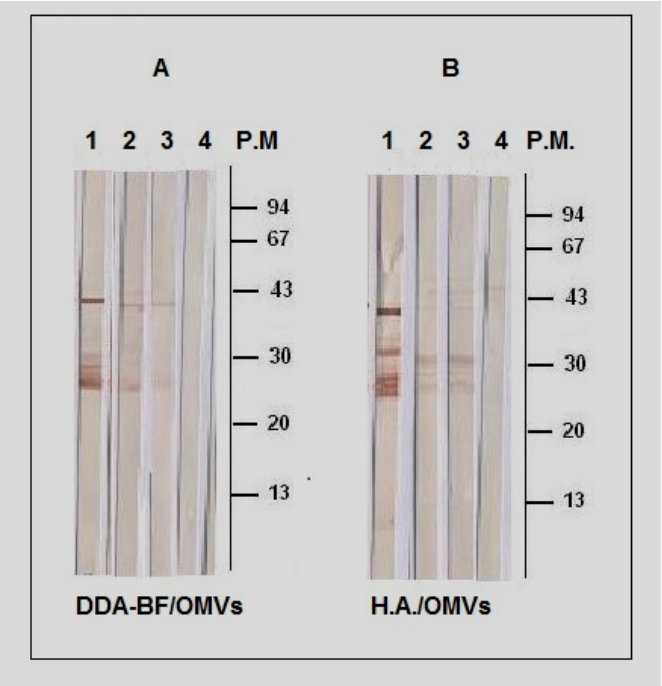
Legenda: Porcentagem de inchaço das patas dos animais desafiados com 2 µg de OMVs de *N. meningitidis.* Quatoze dias após a primeira dose de imunização os animais foram desafiados, nas patas esquerdas, com 2 µg de OMVs de *N. meningitidis.* O diâmetro das patas desafiadas foi mensurado 24 horas após o desafio, e expresso como porcentagem de inchaço em relação as patas contralaterais (normais). OMVS+DDA = soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS+HA = soro dos animais imunizados com H.A./OMVs de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.9; OMVS = soros controle de camundongos imunizados apenas com OMVs de *N. meningitidis* B:4:P1.9; DDA = soros controle de camundongos imunizados apenas com DDA-BF; HA = soros controle de camundongos imunizados apenas com hidróxido de alumínio. Barras representam o erro médio. * $p<0,05$.

4.10 Reatividade específica de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas, por *immunoblot*, para a cepa homóloga.

A especificidade dos anticorpos produzidos nos soros dos grupos de camundongos imunizados por via subcutânea, quinze dias após a primeira imunização, foi realizada por *immunoblot,* considerando-se a reatividade frente a antígenos da cepa homóloga B:4:P1.9. Após a revelação, com AEC, acetato de sódio e água oxigenada, as membranas de nitrocelulose foram analisadas segundo as proteínas reconhecidos por IgG presente nos soros. O reconhecimento dos antígenos da cepa foi homogêneo.

O que se observa, tanto para o grupo imunizado com DDA-BF/OMVs, quanto para o grupo imunizado com H.A./OMVs é que o reconhecimento de peptídios nos soros se concentrou na faixa de peso 20 - 67 kDa. Antígenos de alto peso molecular não foram reconhecidos. Nos animais imunizados com H.A./OMVs aparecem algumas bandas adicionais, tanto nos soros individuais quanto nos *pools*. Nos soros *pool*, as bandas de proteínas reconhecidas pelos anticorpos IgG dos soros foram similares às reconhecidas pelos soros de animais individuais, porém estas se apresentaram mais intensamente marcadas, além de ser possível a observação de bandas adicionais. Os soros controle pré-imunes não reconheceram nenhum peptídio, como era o esperado.

Figura 14 – *Immunoblot* para análise da reatividade específica da cepa homóloga de *N. meningitidis* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam uma dose de imunização.



Em A, observamos: 1- soro em *pool* de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs; 2 e 3 - soro individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs; 4 – soro controle de camundongo imunizado apenas com DDA-BF.

Em B, observamos: 1- soro em *pool* de camundongos imunizados com H.A./OMVs; 2 e 3- soro individual de camundongo imunizado com H.A./OMVs; 4- soro controle de camundongo imunizado apenas com H.A.

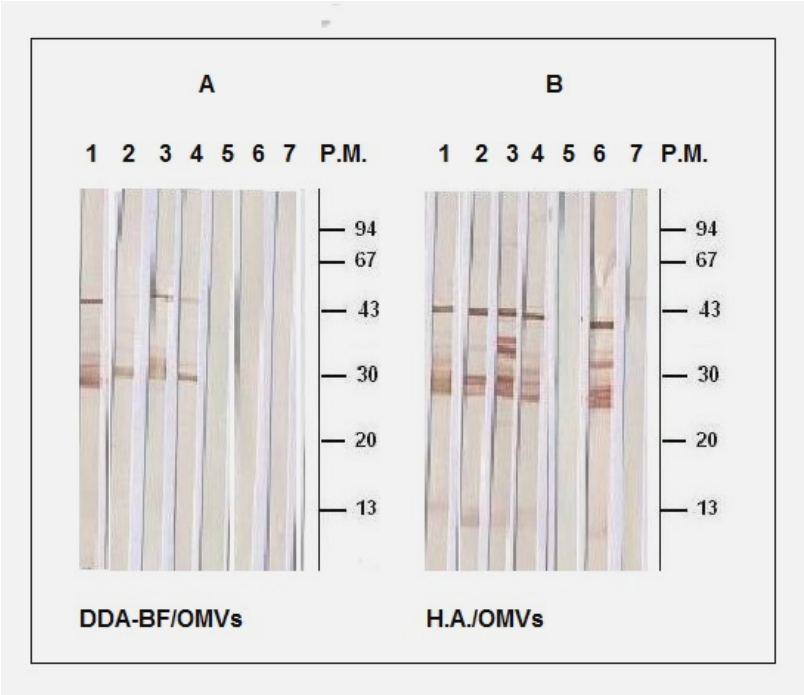
4.11 Reatividade específica de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas, por *immunoblot*, para a cepa homóloga

Da mesma forma relatada no item anterior, por *immunoblot* foi possível analisar a especificidade dos anticorpos IgG presentes nos soros dos camundongos imunizados por via subcutânea com duas doses das preparações antigênicas DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs de *N. meningitidis* frente à cepa homóloga B:4:P1.9. Os soros foram analisados individualmente e em *pool*.

Assim como no soro dos animais imunizados uma única vez (figura 14 A) com DDA-BF/OMVs, há, nos animais imunizados com duas doses, um predomínio no reconhecimento de antígenos situados na faixa entre 20 a 43kDa (fig. 15A). Além disso, as bandas reconhecidas pelo *pool* de soros também aparecem mais fortemente marcadas que as reconhecidas pelos soros de animais individuais, e é possível notar o aparecimento de bandas adicionais. É importante notar (figura 15 A) que houve uma heterogeneidade da resposta individual dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs. Por exemplo, a banda de cerca de 30 kDa no animal representado pela linha 3 da figura 15A, enquanto que o antígeno de cerca de 43 kDa, facilmente vizível nos animais representados pelas linhas 3 e 4, praticamente não aparece marcado no animal repesentado pela linha 2 (figura 15 A). Ademais, nos animais representados pelas linhas 5 e 6 não houve marcação vizível.

Nos animais imunizados com duas doses de H.A./OMVs, também foi observado heterogeneidade no reconhecimento das respostas individuais, com predomínio no reconhecimento de antígenos entre 20 a 30 kDa e 43 kDa (figura 15 B). As bandas reconhecidas pelo *pool* de soros foram mais fortemente reconhecidas, de modo geral, nos antígenos que se situavam entre 20 - 43kDa. Bandas de menor peso molecular (verificadas abaixo de 13 kDa) foram fracamente reconhecidas pelo *pool* e por um soro individual (figura 15 B, números 1 e 2 respectivamente). Os antígenos foram mais fortemente reconhecidos pelos anticorpos produzidos pela imunização com H.A./OMVs.

Figura 15 – *Immunoblot* para análise da reatividade específica da cepa homóloga de *N. meningitidis* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam duas doses de imunização.



Em A, observamos: 1- soro em *pool* de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs; 2, 3, 4, 5 e 6 - soro individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs; 7 – soro controle de camundongo imunizado apenas com DDA-BF.

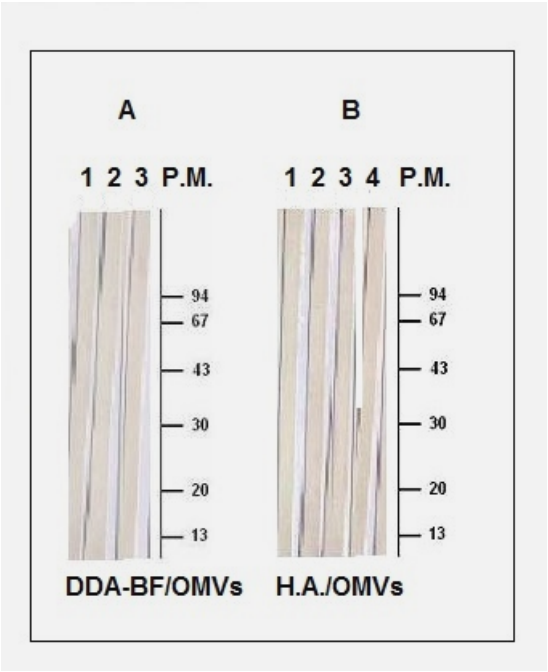
Em B, observamos;1,2,3,4, e 5 - soro individual de camundongo imunizado com H.A./OMVs; 6 - soro em *pool* de camundongos imunizados com H.A./OMVs; 7- soro controle de camundongo imunizado apenas com H.A.

4.12 Reatividade a antígenos de reatividade cruzada de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot*, para a cepa heteróloga B:4.P1.15

Por meio de *immunoblot* foi possível verificar a resposta de IgG produzidos nos soros de camundongos imunizados com apenas uma dose das preparações antigênicas, em relação à antígenos de reatividade cruzada com a cepa B:4:P1.15. Para isso as membranas de nitrocelulose para *immunoblot* foram carregadas com proteínas de extrato total da cepa heteróloga, após separação eletroforética por SDS-

PAGE. Com 15 dias de imunização, não houve reconhecimento de peptídios em nenhum dos soros analisados, nos dois grupos experimentais, DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs (figura 16 A e 16 B, respectivamente). Não foram testados soros em *pool* para esta cepa. Não houve reconhecimento de antígenos de reatividade cruzada para a cepa homóloga nos soros controle.

Figura 16 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa heteróloga de *N. meningitidis* (B:4:P1.15) pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam uma dose de imunização..



Em A, observamos: 1 e 2- soro individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs; 3- soro controle de camundongo imunizado apenas com DDA-BF.

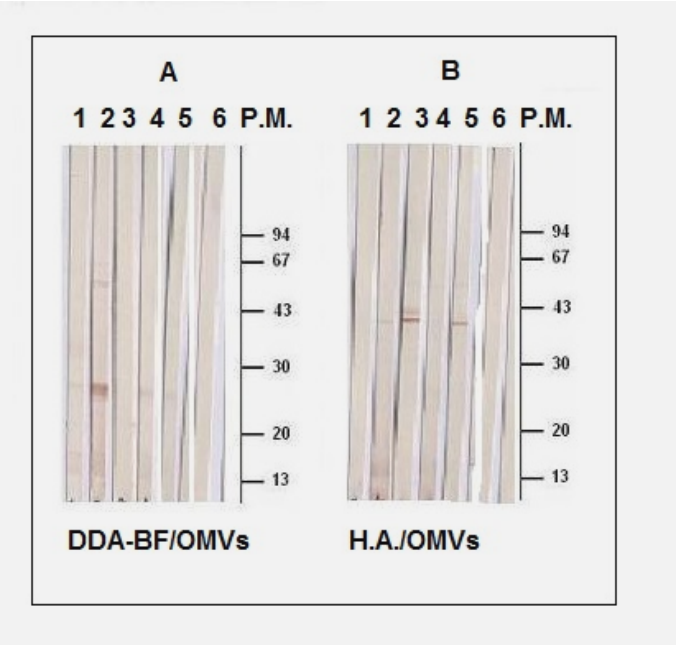
Em B, observamos: 1, 2 e 3- soro individual de camundongo imunizado com H.A./OMVs; 4- soro controle de camundongo imunizado apenas com H.A.

4.13 Reatividade a antígenos cruzados de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot*, para a cepa heteróloga B:4.P1.15

Os soros dos camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs, como se observa na figura 17 A, obtiveram um reconhecimento aos peptídios presentes na cepa B:4:P1.15 de modo heterogêneo e fraco, após 60 dias de imunização, por via subcutânea, em que duas doses foram recebidas. Como se observa na figura 17 A, o soro número um, referente ao *pool* reconheceu proteínas de peso molecular abaixo de 15 kDa de modo bastante fraco, e de aproximadamente 28 kDa; o soro número 2 reconheceu proteínas entre 43 – 67 kDa; o soro 3 não reconheceu proteínas, e os soros 4 e 5 reconheceram proteínas de aproxiadante 20-30 kDa fracamente.

Na figura 17 B, podemos observar que, no grupo imunizado com H.A./OMVs a resposta a antígenos de reatividade cruzada com a cepa heteróloga foi um pouco menor, mas ainda assim os anticorpos reconheceram fracamente peptídios entre 30-43 kDa em um dos soros, e de 30-34 kDa e 50-59 kDa em outro. O soro *pool* reconheceram antígenos de peso molecular entre 30- 43 kDa. Soros controle não reconheceram peptídios para a cepa heteróloga.

Figura 17 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa heteróloga de *N. meningitidis* (B:4:P1.15) pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam duas doses de imunização.



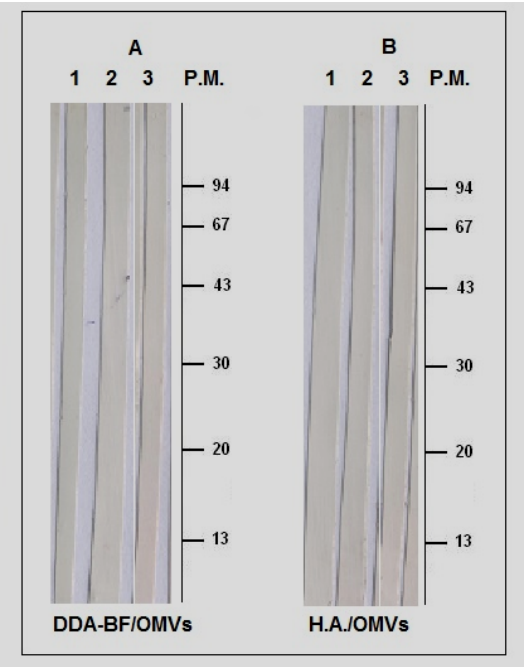
Em A, observamos: 1, 2, 3, e 4- soro individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs; 5- soro em *pool* de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs; 6- soro controle de camundongo imunizado apenas com DDA-BF.

Em B, observamos: 1, 2, 3 e 4- soro individual de camundongo imunizado com H.A./OMVs; 5- soro em *pool* de camundongos imunizados com H.A./OMVs; 6- soro controle de camundongo imunizado apenas com H.A.

4.14 Reatividade a antígenos de reatividade cruzada de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com uma dose das preparações antigênicas, por meio de *Immunoblot* , para *N. lactamica*

Por meio de *immunoblot* foi possível verificar se os anticorpos produzidos nos soros dos camundongos reconheceram peptídios de reatividade cruzada com *N. lactamica*, com uma dose das preparações antigênicas. Com quinze dias após a imunização, os soros de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs, assim como H.A./OMVs (figura 18 A e B) não reconheceram antígenos para a cepa comensal.

Figura 18 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa comensal *N. lactamica* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam uma dose de imunização.



Em A, observamos: 1 e 2- soro individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs; 3- soro controle de camundongo imunizado apenas com DDA-BF.

Em B, observamos: 1 e 2- soro individual de camundongo imunizado com H.A./OMVs; 3- soro controle de camundongo imunizado apenas com H.A.

4.15 Reatividade a antígenos de reatividade cruzada de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com duas doses das preparações antigênicas, por meio de *immunoblot,* para *N. lactamica*.

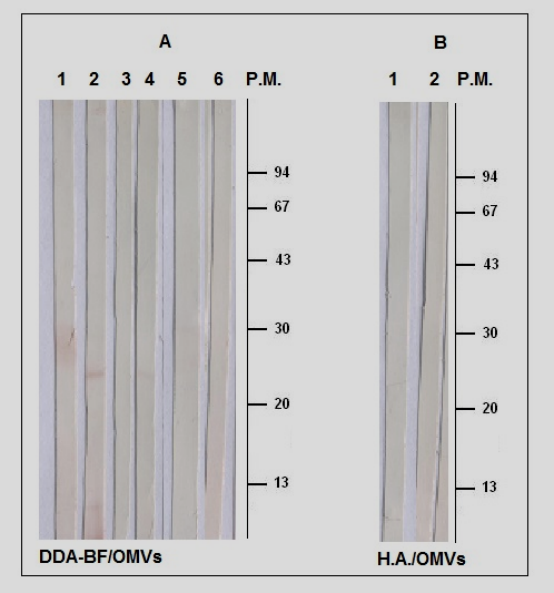
Em soros obtidos após 60 dias de imunização, após duas doses das preparações antigênicas, a reatividade cruzada a antígenos de *N. lactamica* por anticorpos IgG produzidos nos soros também foi analisada.

Observamos, na figura 19 A, que os soros dos camundongos imunizados com DDA-BF/ OMVs a resposta foi heterogênea. O reconhecimento para antígenos cruzados foi bastante fraco, sendo mesmo de difícil observação pela figura, porém, em

média situou-se entre os pesos 20-30 kDa, como se observa nos números 2 e 3. No *pool*, após 60 dias, foram reconhecidos antígenos de 35-49 kDa, não sendo visualizada na figura pelo fraco reconhecimento desta proteína.

No grupo imunizado com H.A./OMVs, não houve reconhecimento de antígenos de reatividade cruzada de *N. lactamica* pelos anticorpos IgG presentes no soro *pool* após duas doses recebidas, o que já difere, em grande parte, da resposta obtida pelo grupo anteriormente citado (figura 19 B). Nos soros controles também não houve reconhecimento de antígenos de reatividade cruzada com *N. lactamica*.

Figura 19 – *Immunoblot* para análise da reatividade cruzada da cepa de *N. lactamica* pelos anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos que receberam duas doses de imunização.



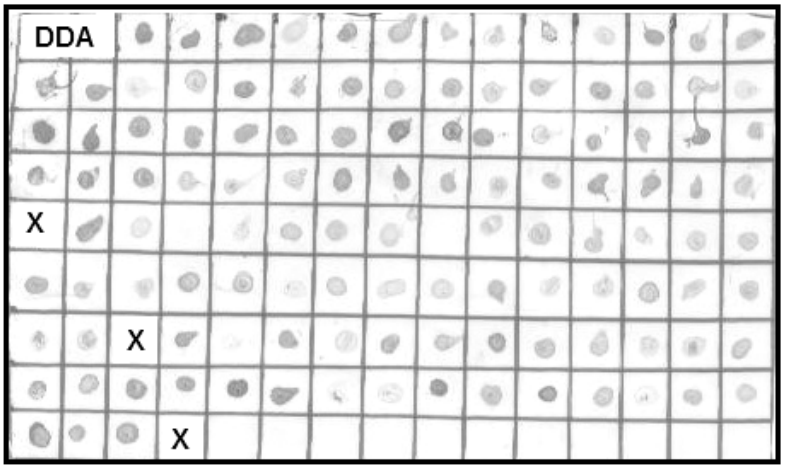
Em A, observamos: 1, 2, 3 e 4- soro individual de camundongo imunizado com DDA-BF/OMVs; 5- soro *pool* de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs; 6- soro controle de camundongo imunizado apenas com DDA-BF.

Em B, observamos: 1- soro *pool* de camundongos imunizados com H.A./OMVs; 2- soro controle de camundongos imunizados apenas com H.A.

4.16 Reatividade de anticorpos IgG do soro dos camundongos após duas doses de imunização, com cepas meningocócicas isoladas de pacientes que apresentaram DM nos anos de 2011/2012, por Dot-ELISA.

No grupo imunizado com DDA-BF/OMVs, houve o forte reconhecimento de antígenos das cepas meningocócicas isoladas de pacientes nos anos de 2011 e 2012 pelos anticorpos presentes no *pool* de soros deste grupo. O reconhecimento, como se nota na figura 20, foi de 93 cepas das 119 totais analisadas. Para isso, podemos concluir que houve o reconhecimento de 93% das cepas testadas.

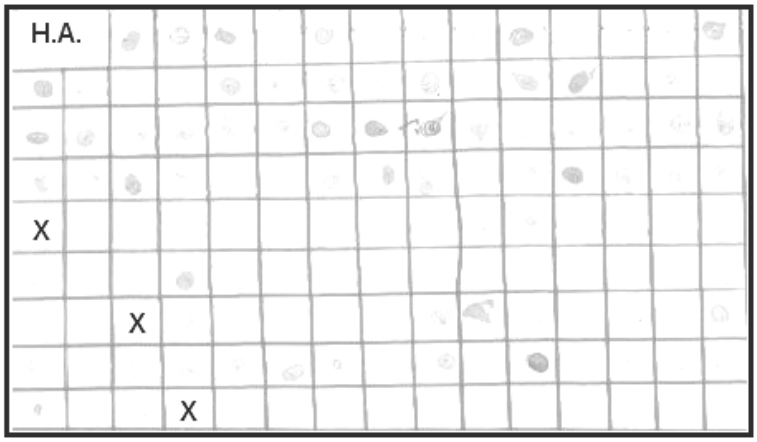
Figura 20 – Avaliação das cepas isoladas de pacientes com DM nos anos 2011-2012 pelos anticorpos IgG presentes no soro de camundongos imunizados *"pool"* com DDA-BF/OMVs, após duas doses de imunização.



Na membrana foram aplicadas bactérias íntegras de cada uma das cepas na sequêcia como apresentado no apêndice. Cada ponto representa uma cepa distinta. As membranas foram incubadas com *pool* de soro de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs, após duas doses de imunização e com anticorpo secundário anti-IgG. Os espaços da membrana marcados com X representam intervalos de parada nas quais não há cepa aplicada.

No grupo imunizado com H.A./OMVs, os anticorpos IgG produzidos no soro também tiveram bom reconhecimento pelos antígenos das cepas avaliadas, porém, de modo inferior ao grupo imunizado com DDA/OMVs, pois reconheceu menor número de cepas e de modo mais fraco. Nota –se, na figura 21, que houve um reconhecimento de 23 cepas no total das 119 analisadas, totalizando 19% de reconhecimento .

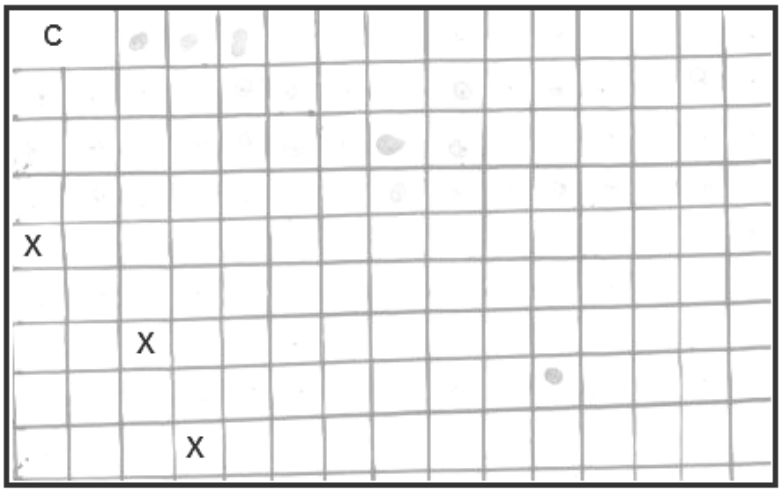
Figura 21 – Avaliação das cepas isoladas de pacientes com DM nos anos 2011-2012 pelos anticorpos IgG presentes no soro de camundongos *"pool"* imunizados com H.A./OMVs, após duas doses de imunização.



Na membrana foram aplicadas bactérias integras de cada uma das cepas na sequêcia como apresentado no apêndice. Cada ponto representa uma cepa distinta. As membranas foram incubadas com *pool* de soro de camundongos imunizados com H.A./OMVs, após duas doses de imunização e com anticorpo secundário anti-IgG. Os espaços da membrana marcados com X representam intervalos de parada nas quais não há cepa aplicada.

No *pool* de soros dos grupos controle, (foi feito um pool dos soros de todos os grupos controle, ou seja, animais imunizados com DDA-BF, H.A. e OMVs) ao analisarmos a resposta por número de cepas reconhecidas, observamos que houve um pequeno reconhecimento, porém, ao ser analisada a intensidade, a quase totalidade foi fracamente reconhecida que não pode ser considerada como significante.

Figura 22 – Avaliação das cepas isoladas de pacientes com DM nos anos 2011-2012 com soro normal *"pool"* de camundongos .



Nas membranas foram aplicadas bactérias integras de cada uma das cepas na sequêcia como apresentado no apêndice. Cada ponto representa uma cepa distinta. As membranas foram incubadas com *pool* de soro de camundongos dos grupos controle com anticorpo secundário anti-IgG. Os espaços da membrana marcados com X representam intervalos de parada nos quais não há cepa aplicada.

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo tiveram como objetivo avaliar a imunogenicidade das preparações antigênicas baseadas em OMVs de *N. meningitidis* B complexados a dois diferentes adjuvantes, o lípide catiônico DDA-BF e o mais amplamente utilizado, hidróxido de alumínio (H.A.). Para isto, camundongos fêmeas não isogênicos foram imunizados por via subcutânea, e a produção de anticorpos IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b foi avaliada por ELISA. A avidez dos anticorpos IgG produzidos em resposta à imunização também foi avaliada por ELISA, uma vez que o índice de avidez de anticorpos para o meningococo apresentam correlação linear com a atividade bactericida no soro (GRANOFF et al., 1998). A reatividade específica com a cepa homóloga e a reatividade a antígenos cruzados com cepa heteróloga de *N. meningitidis* B:4:P1.15 e da espécie comensal *N. lactamica* foram avaliadas por *Immunoblot* . Os animais foram desafiados com OMVs da cepa homóloga no coxim plantar da pata esquerda no 14° dias após a primeira dose, para avaliação de hipersensibilidade tardia (HTT). As OMVs foram escolhidas como antígeno porque estas contém os componentes de membrana externa das bactérias, inclusive uma variedade de antígenos que podem ser imunogênicos e que têm demonstrado ser importantes quando usados em preparações vacinais (ROSENQVIST et al., 1998 ;HOLST et al., 2013;).

Vacinas contra os sorogrupos A, C, X e W135 baseadas em polissacarídios estão disponíveis para uso, entretanto, polissacarídios capsulatres do sorogrupo B são similares ao ácido polissiálico, presentes em glicoproteínas humanas e não podem ser usados em vacinas, pois estes antígenos, além se pouco imunogênicos, podem causar autoimunidade (HAYRIEN et al., 1995). Desta forma, antígenos de OMVs contra o sorogrupo B de *N. meningitidis* têm sido explorada desde 1970. Intervenções na saúde pública em Cuba, Noruega e Nova Zelândia têm sugerido que as vacinas que levam em sua composição proteínas de membrana externa, presentes nas OMVs, podem prevenir a doença meningocócica pelo sorogrupo B (HOLST et al., 2013).

DDA-BF é um lípide catiônico que tem sido frequentemente usado como adjuvante em grandes concentrações (>1mM), que podem ser tóxicas (KATZ et al.,

1994). Este lípide tende a formar vesículas fechadas. Entretanto, quando preparados por desrupção ultrasônica em solução de baixa força iônica, o DDA forma fragmentos de bicamada (DDA-BF) (figura 6). Estes fragmentos de bicamada de DDA (DDA-BF), que foram usados no presente trabalho como adjuvante, apresentam como principal vantagem a baixa concentração de lípide em comparação às doses necessárias para formulações lipossomicas (1-10mM) (DAVIDSEN et al., 2005); permitindo, desta forma, redução do custo e da toxicidade das formulações adjuvantes.

No presente estudo, as interações entre DDA-BF e OMVs foram analisadas numa baixa força iônica (1mM), eliminando o possível efeito de agregação associado ao uso de uma alta força iônica, a qual é geralmente usada para ressuspender proteínas. Numa condição de baixa força iônica, devido à repulsão eletrostática, os fragmentos de bicamada positivamente carregados permanecem coloidalmente estável em dispersões aquosas (CARMONA-RIBEIRO et al., 2006).

A complexação do DDA-BF às proteínas é evidenciada pela mudança na carga e no tamanho das partículas, com a adição da OMVs. A estabilidade coloidal do complexo está associada à obtenção de partículas pequenas (LINCOPAN et al., 2009). Já a carga final do complexo depende tanto da natureza da proteína adsorvida, quanto das concentrações de proteína e DDA-BF. A interação de OMVs de meningococo B, em diferentes concentrações proteicas (5, 25, 50, 100 e 200 µg/ml), com 0,1 mM de DDA-BF foi avaliada para a determinação da melhor concentração de proteína a ser usada como antígeno. Esta concentração deve ser a maior quatidade de proteína adsorvida ao DDA-BF em que a carga final permanece positiva e que não há agregação das partículas em grandes complexos (superiores a 500 nm), já que grandes a estabilidade coloidal depende da obtenção de partículas pequenas (LINCOPAN et al., 2009) e é esperado que partículas menores do que 500 nm possuam ótimo tamanho para serem absorvidas pelas células dendríticas, promovendo melhor resposta imune (XIANG et al., 2006).

O hidróxido de alumínio, adjuvante amplamente utilizado, complexado às OMVs foi usado em comparação ao DDA-BF/OMVs em nosso laboratório, com resultados

promissores induzindo a produção de anticorpos IgG de alta avidez (GASPAR et al., 2013).

Os animais usados no presente estudo são não isogêncios e o sangue de cada animal foi coletado separadamente, visando-se analisar a resposta individual. Os animais foram imunizados duas vezes com intervalo de 15 dias. Estes foram sangrados no 15° e 60° dias após a primeira imunização. A produção de anticorpos IgG foi avaliada após uma e duas doses de imunização, respectivamente. Por meio de ELISA, pudemos observar que após uma dose, a produção de anticorpos foi significativamente maior no grupo de camundongos imunizados com H.A./OMVs em relação ao grupo imunizado com DDA-BF/OMVs. A produção de IgG no grupo imunizado com DDA-BF/OMVs não foi significativa em relação aos controles. Porém, 60 dias após a primeira imunização, quando os animais já haviam recebido duas doses de antígeno, não houve diferenças significativas na produção de IgG entre os grupos imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs. A análise mostrou-se, portanto, homogênea, sugerindo que os camundongos imunizados com duas doses desenvolveram boa resposta humoral.

O índice de avidez (IA) foi avaliado 60 dias após a primeira imunização, depois que os animais receberam duas doses das preparações antigênicas. Os resultados obtidos pelos dois grupos DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs apresentaram índices de intermediária à alta avidez, sugerindo que os dois adjuvantes, complexados às OMVs, foram capazes de produzir anticorpos IgG com boa força de ligação entre antígeno-anticorpo. Nos soros *pool* do grupo DDA/OMVs se observou IA intermediário e no *pool* do grupo H.A./OMVs o IA foi alto. É importante notar que, um aumento no IA dos anticorpos é essencial para a proteção contra a DM, pois está associado com o aumento da atividade bactericida do soro, independente dos níveis de anticorpos específicos e da distribuição de isótipos. Portanto, a medição do IA pode ser um método suplementar para se predizer uma imunidade protetora durante a avaliação de uma vacina contra o sorogrupo B (VERMONT et al., 2002). Estudos com crianças menores de 12 meses infectadas com meningococos B geraram anticorpos IgG com baixa avidez, e, assim, quase ausência de atividade bactericida no soro. O contrário se verifica em crianças acima de 10 anos (POLLARD; LEVIN, 2000).

Os isótipos IgG também foram analisados 60 dias após a primeira imunização. Os títulos de IgG1 apresentaram-se significativamente maiores nos soros de camundongos imunizados com H.A./OMVs, tanto em relação aos controles quanto em relação ao grupo imunizado com DDA-BF/OMVs.

A determinação dos isótipos IgG em resposta à infecção ou vacinação oferece uma visão sobre qual o tipo de resposta imune foi desenvolvida. Após uma imunização vacinal, passa a ser um importante parâmetro se esta promove uma resposta T – independente, como no caso das vacinas meningocócicas polissacarídicas, que resultam também em anticorpos de curta duração, ou se T-dependente, quando estes polissacarídios são conjugados a proteínas, promovendo anticorpos de longa duração (DIAKUN et al., 1997). As citocinas secretadas pelas células T auxiliaries podem, diferencialmente, regular as mudanças de classes sofridas nos anticorpos secretados pelos linfócitos B. Em camundongos, as citocinas envolvidas na resposta de tipo Th2, assim como a IL-4, promovem a mudança dos isótipos de IgM e IgD para IgG1 e IgE, enquanto que as citocinas envolvidas na resposta Th1, como a IL-2 e IFN –γ promovem a mudança de classe para IgG2a e IgG2b (MOSMANN; COFFMAN, 1989; PAUL ; SEDER, 1994).

Enquanto que o hidróxido de alumínio promoveu a produção de todos os isótipos IgG, o DDA-BF produziu apenas a produção de IgG2a e IgG2b, sugerindo um dericionamento da resposta imunológica para um padrão Th1.

Sabe-se, por estudos anteriores, que as respostas promovidas pelo hidróxido de alumínio são do tipo Th2, e que polissacarídios capsulares geralmente estimulam maior produção de IgG2a em adultos, e em crianças, geralmente estimulam a produção de IgG1(AMBROSINO et al., 1994).

Na análise do isótipo IgG2a, 60 dias após a primeira imunização, embora os dois grupos tenham produzido este isótipo de IgG, apenas nos animais imunizados com H.A./OMVs apresentaram em seus soros, níveis de anticorpos significativamente superiores em relação aos dos controles, porém também não houve diferença estatística na produção de IgG2b entre os grupos imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, sendo que o grupo H.A./OMVs apresentou maior título. O isótipo IgG2a tem

grande importância ao se tratar de imunidade duradoura, da qual indica resposta do tipo Th1, como comentado anteriormente (DIAKUN et al., 1997).

A quantificação do isótipo IgG2b em soros de camundongos imunizados com 2 doses das preparações antigênicas, foi similar entre os grupos experimentais e significativamente superior aos controles. Esta subclasse de IgG é de anticorpos opsonizantes e também pode estar relacionada à imunidade celular, o que já foi verificado em trabalhos anteriores quando se utilizou DDA como adjuvante (GASPAR et al., 2013; HILGERS; SNIPPE, 1992).

Embora o hidróxido de alumínio seja efetivo para muitas vacinas e o mais amplamente utilizado, este promove primariamente uma resposta Th2 (incluindo a produção de IL-4 e IL-5, IgG1 e IgE pelas células B), o que ainda é ineficiente para muitas outras preparações vacinais contra muitos patógenos. Este adjuvante é usado em vacinas que incluem tétano, difteria, pertussis, hepatite A, pólio, sendo o único aprovado para uso nos Estados Unidos (LINDBLAD, 2004). Além disso, já são conhecidos seus efeitos adversos, como reações alérgicas e granulomas, que podem aparecer em alguns indivíduos. Assim, embora seja um adjuvante largamente utilizado, o surgimento de novos adjuvantes é necessário para ajudar a modular uma resposta imune celular (NICHOLS et al., 2010).

Uma das maiores vantagens ao empregar um adjuvante baseado em lípide catiônico é a habilidade deste em adsorver antígenos de cargas negativas, assim como as OMVs de *N . meningitidis* . O complexo formado entre o antígeno e o DDA-BF ocorre por efeito hidrofóbico já que as OMVs possuem fosfolípides e lipoproteínas (MASHBURN et al., 2008). Ao buscar-se partículas de antígeno-adjuvante com carga final positiva, como no caso da preparação antigência DDA-BF/OMVS, visa-se facilitar a endocitose do antígeno por células apresentadoras de antígeno (APCs), por interações eletrostáticas, uma vez que as membranas das células são negativamente carregadas. DDA-BF produz resposta do tipo Th1, gerando anticorpos de longa duração (CARMONA-RIBEIRO, 2010).

A verificação da hipersensibilidade tardia (HTT) nos sugere que tanto DDA-BF quanto H.A. foram capazes de gerar imunidade celular após uma dose das preparações

antigênicas recebidas (DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs). O pequeno inchaço observado nos grupos controle, entretanto, pode ser em função da inflamação local causada pela injeção de um volume de líquido relativamente grande. Em um estudo anterior, ao usar como antígeno OMVs de *N. lactamica* complexados a DDA-BF e H.A., Gaspar et al. também verificaram o aumento no diâmetro das patas usada no desafio quando se utilizou DDA-BF como adjuvante, quando os animais receberam apenas uma dose de imunização. Foi preciso de mais uma dose de imunização para que o grupo imunizado com H.A./OMVs conseguisse os resultados alcaçados (HTT) no grupo que utilizou DDA-BF/OMVs (GASPAR et al., 2013). Embora estes resultados sejam divergentes dos resultados aqui apresentados, é importante notar que naquele trabalho a OMVS usada era da espécie comensal *N. lactamica* .

A análise de *Immunoblot* permitiu a avaliação qualitativa e específica, do soro dos animais imunizados com OMVS, tanto a antígenos de cepa homóloga, quanto de cepa heteróloga de *N. meningitidis,* e de *N. lactamica,* visando a identificação de antígenos de reatividade cruzada, tanto após uma, quanto após duas doses de imunização.

Para análise do reconhecimento de antígenos específicos com a cepa homóloga, soros de camundongos imunizados com uma dose (15 dias após a primeira imunização) apresentaram uma resposta homogênea, em que os anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, reconheceram principalmente antígenos de peso 20 - 43 kDa de modo geral, sugerindo que os pesos moleculares possam estar relacionados às classes 5 (Opa e Opc – 26 a 30 kDa), classe 4 (33-34 kDa); classes 2/3 (PorB, 37-42 kDa) e à classe 1 (PorA – 43 kDa). Os soros *pool* também apresentaram reconhecimento homogêneo e o reconhecimento de bandas adicionais, onde peptídios entre 20 – 43 kDa foram reconhecidos, sugerindo se relacionar às classes acima mencionadas.

Após a segunda dose (totalizando 60 dias da primeira imunização), o reconhecimento de peptídios pelos anticorpos IgG no soro dos camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs foi heterogêneo. Cada soro, ao ser analisado individualmente, reconheceu diferentes antígenos como o de 30 kDa e o de 43 kDa, isoladamente. De modo geral, houve o reconhecimento de antígenos entre os pesos moleculares de 20-43 kDa, como obtido com apenas uma imunização. O *pool* de soros

recocheceu mais fortemente alguns antígenos e também foi possível observar bandas adicionais. No grupo imunizado com H.A./OMVs, a resposta foi mais homogênea quando analisada individualmente, em que os anticorpos presentes nos soros reconheceram de modo geral, proteínas entre 20-43 kDa, mas antígenos de peso menor (abaixo de 13 kDa) foram reconhecidos em alguns soros.

As porinas expressas pelos meningococos (PorA e PorB) fornecem sinais para a indução de imunoglobulinas espécie-específica para meningococos . A PorA (classe1) é o alvo frequentemente reconhecido por anticorpos bactericidas presentes no soro, e está sendo muito usada em estudos para vacinas meningocócicas desde que se descobriu sua importância no contexto da variabilidade destas bactérias. As PorB, classificadas como classes 2 ou 3, são as maiores porinas presentes na membrana externa, e são capazes de se inserir nas membranas das células alvo para facilitar ligação e posterior invasão pelo meningococo, e também podem afetar a maturação do fagossomo, uma vez internalizadas. Em alguns estudos, ficou demonstrado que a PorB pode ser a causa do influxo celular de Ca++ e indução de apoptose em células alvo (TZENG ; STEPHENS, 2000).

Proteínas envolvidas na aquisição do ferro (IROMPS), como a lactoferrina e a transferrina, também colaboram para o aumento do potencial patogênico. A Lbp (lactoferrin-binding protein) possui peso molecular de 100 kDa aproximadamente e a FrpB (iron restriction protein), em torno de 70 kDa.

Não houve reconhecimento de antígenos de reatividade cruzada com a cepa heteróloga B:4:P1.15, pelos anticorpos presentes nos soros dos camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs, após uma dose das preparações antigênicas recebidas. Após duas doses, os soros dos camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs reconheceram fracamente um grande número de antígenos, mas não houve homogeneidade nestas respostas, pois isoladamente, houve reconhecimento de antígenos nos pesos: aproximadamente 15 – 29 kDa, onde podemos sugerir os antígenos NspA e de classe 5 (Opa e Opc); 43-67 kDa sugerindo classe 1 (PorA), e de 30-30 kDa (também sugestivo de classe 5). No grupo de camundongos imunizados com H.A./OMVs, um menor número de antígenos foram reconhecidos, e também não houve homogeneidade, sendo que antígenos entre 30 – 43 kDa (classes 5 – Opa e

Opc; classe 4 - RmpM; classes 2/3 – PorB; classe1 – Por A) foram fracamente reconhecidos por soros individuais e *pool*. O diferencial foi observado em um soro individual que foi capaz de reconhecer antígenos na faixa de aproximadamente 50-59 kDa, sugerindo que o adjuvante H.A. direciona a resposta para um padrão heterogênio, podendo assim simular a resposta imune referente a que ocorre na população, onde os indivíduos não são genéticamente idênticos .

As proteínas de classe 4, estão como as porinas B de classes 2/3 na membrana externa e possuem a habilidade de bloquear anticorpos opsonizantes. Proteínas de classe 5 são importantes na patogênese da DM e induzem anticorpos bactericidas . As Opa são variáveis quanto ao número e expressão, tamanho, antigenicidade e facilitam a aderência através dos receptores CD66 humanos, que são receptores desta proteína. A proteína Opc (também conhecida por 5C) também está envolvida no processo de aderência às células eucarióticas. Ao se ligar à vitronectina que participa da adesão às células endoteliais pela interação com as integrinas, facilita a invasão meningocócica (TZENG; STEPHENS, 2000).

Quanto à reatividade cruzada a antígenos de *N. lactamica*, no presente estudo, esta análise foi a que apresentou maior diferença entre os grupos. Após uma dose das preparações antigênicas recebidas, nenhum dos grupos reconheceu antígenos de reatividade cruzada.

No período de 60 dias após a primeira imunização (duas doses), os soros provenientes do grupo de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs reconheceram de modo bastante fraco, antígenos entre 20-30 kDa (sugere-se classe 5), e o soro *pool*, de 33-40 kDa (sugere-se classe 4). No grupo imunizado com H.A./OMVs, não houve reconhecimento de antígenos de reatividade cruzada com *N. lactamica* mesmo nos soros *pool.*

Por meio de Dot-ELISA , foi possível verificar, se após duas doses de imunização, os soros *pool* de camundongos imunizados reconheceram antígenos de outras cepas meningocócicas, isoladas de pacientes que apresentaram DM nos anos de 2011/2012. A análise nos mostrou que 88% das cepas foram fortemente reconhecidas pelo grupo de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs. Os soros de camundongos imunizados com H.A./OMVs reconheceram 30% das cepas, porém, de modo mais fraco

em relação ao reconhecimento pelos soros provenientes da imunização com DDA-BF/OMVs. Estas cepas foram classificadas em diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos de *N.meningitidis* por meio de anticorpos monoclonais (Anexo A).

Este estudo contribuiu para demonstrar a imunogenicidade de vacinas baseadas em OMVs complexadas a adjuvantes lipídicos, como o DDA-BF. Pelos resultados obtidos, sugere-se que esta preparação tenha sido imunogênica suficiente para produzir anticorpos IgG nos soros de camundongos não isogênicos, assim como isótipos desta imunoglobulina, relacionados à resposta Th1 (IgG2a e IgG2b). Os camundongos não isogênicos foram escolhidos pelo motivo de representarem da melhor forma a população humana, e as análises com dos soros foram feitas individualmente, sendo um bom parâmetro para se avaliar o quanto específica e heterogênea pode se apresentar a resposta imune contra *N. meningitidis* B. Ao se verificar as reatividades específicas (cepa homóloga) e cruzadas (cepa heteróloga e mais fracamente cepa comensal), nota-se que a resposta ao reconhecimento de antígenos se apresentou na maioria das vezes, heterogênea. O fato de ter havido o reconhecimento de um número maior de antígenos da cepa heteróloga, e de outra espécie de *Neisseria,* pelo soro dos animais imunizados com DDA-BF/OMVs indica uma vantagem deste adjuvante em relação ao H.A. nas preparações antigênicas contendo OMVs de *N. meningitidis,* uma vez que o reconhecimento de antígenos de cepas heterólogas é característica desejável de qualquer vacina. A cepa heteróloga foi a cepa escolhida para fazer parte da preparação de uma vacina no Brasil na época da epidemia em 1970, do qual tivemos maior incidência do sorogrupo B (GORLA et al., 2003).

Embora o reconhecimento de antígenos cruzados com *N. lactamica* tenha sido fraco no grupo imunizado com DDA-BF/OMVs, este resultado representa um ponto positivo pois, muitos estudos apontam que portadores desta espécie possam estar protegidos contra a DM, justamente por apresentarem em seus soros, anticorpos de reatividade cruzada com o meningococo (GASPAR et al., 2013) .

A busca para uma vacina eficaz contra o sorogrupo B se tornou um desafio. Mas, se disponível, seria a melhor forma de prevenção contra a DM. O uso rápido e

generalizado de antibióticos têm contribuído para diminuir de 10 a 20% os casos fatais causados pela DM invasiva no mundo. Apesar dos avanços alcançados no tratamento dos pacientes, ainda persiste uma grande mortalidade, principalmente nos casos de septicemia devido ao rápido progresso da doença (CARTWRIGHT; NOAH; PELTOLA, 2001). Ainda assim, países desenvolvidos restringem a profilaxia com antibióticos contra o meningococo às pessoas que não fazem parte do domicílio ou comunicantes íntimos de pacientes com DM. Além do aumento da possibilidade do surgimento de resistência (como ocorreu com o uso de sulfa na década de 60), há ainda os efeitos colaterais da droga. Há estudos que demonstram que o transmissor da cepa virulenta está entre os comunicantes íntimos do paciente, assim, se expandindo muito a profilaxia, na verdade, estará se erradicando também o estado de portadores de cepas que não causam doença e que conferem imunidade cruzada aos outros meningococos. Portadores assintomáticos normalmente mantém uma diversidade de sorogrupos e sorotipos, muitas vezes não patogênicos, atingindo até 12% da população (HIDALGO, 2003).

Nos últimos 50 anos, a compreensão sobre a importância da DM por si, o impacto social, os efeitos da doença, e o papel de vacinas baseadas em OMVs fornecendo proteção, tem evoluído substancialmente (HOLST et al., 2013). Atualmente as OMVs usadas em vacinas são extraídas com detergente, para diminuir o LPS das vesículas nativas, e deste modo se tornam seguras para o uso intramuscular em humanos (ROSENQVIST et al., 1998). A proteção promovida por vacinas baseadas em OMVs de *N. meningitidis* é devido à produção de anticorpos bactericidas no soro (HOLST et al., 2003), o que depende da PorA presente na superfície da cepa, da qual tem a desvantagem de ser variável em cada cepa meningocócica , levando à necessidade de periódicas mudanças na formulação vacinal (OLIVER et al., 2002).

Hoje sabemos que essas vacinas são mais efetivas quando usadas em epidemias em que a cepa causadora seja homóloga, ou um clone que possui a mesma PorA presente na vacina. Quando usadas em doença endêmica ou em surtos, em que encontramos diferentes cepas como causadoras, o nível de efetividade geralmente tende a ser mais baixo. Além disso, múltiplas doses de uma mesma vacina devem ser administradas para promover proteção primária e o recebimento de uma segunda dose

é necessário para certificar-se de que haverá proteção a longo prazo, especialmente nos que recebem a vacina ainda bebês (HOLST et al., 2013).

No presente estudo, aparentemente o H.A. foi superior, em relação à produção de IgG e IgG1 quando comprado ao DDA-BF. Ambos adjuvantes, quando complexados às OMVs de *N. meningitidis* foram similares ao induzir resposta celular avaliada pela HTT. DDA-BF foi aparentemente superior no que diz respeito à indução de imunidade cruzada com cepa heteróloga e comensal (*N. lactamica*) e cepas isoladas de pacientes com DM nos anos de 2011/2012 por meio de Dot- ELISA. Neste método utilizamos bactérias integras e não componentes denaturados após serem tratadas com solução desnaturante como no SDS-PAGE . Sugere-se que os dois adjuvantes foram capazes de gerar anticorpos da classe IgG2a e IgG2b.

No final de 2012, mais de 60 milhões de doses de vacinas baseadas em OMVs foram administradas no mundo. Programas informativos para o público a fim de mostrar a importância desta vacina aos destinatários também contribuíram para a aceitação pública (HOLST; NOKLEBY; BETTINGER, 2012).

6 CONCLUSÃO

- OMVs na concentração de 2µg de proteína/animal, tanto complexadas a DDA-BF, quanto a H.A., foram capazes de gerar anticorpos da classe IgG nos soros de camundongos não isogênicos, imunizados com duas doses, por via subcutânea;
- O H.A foi superior ao DDA-BF em relação à habilidade em auxiliar a geração de imunidade humoral, uma vez que, uma dose de imunização com H.A./DDA-BF foi suficiente para induzir a produção de IgG total, enquanto que, para alcançar este efeito foram necessárias duas doses de DDA-BF/OMVs. Com relação aos índices de avidez (IA) dos anticorpos IgG total produzidos após duas doses de imunização, H.A. também mostrou efeito adjuvante superior ao DDA-BF, uma vez que nos animais imunizados com H.A./OMVs os IA foram de intermediários a altos, enquanto que nos animais imunizados com DDA-BF/OMVs os Ias foram todos intermediários;
- A preparação antigênica DDA-BF/OMVS, após duas doses de imunização, foi capaz de induzir a produção dos isótipos IgG2a e IgG2b, e não induziu a produção e anticorpos IgG1. Já o complexo H.A./OMVs, após duas doses de imunização, foi capaz de gerar nos a produção de todos os isótipos testados(IgG1, IgG2a eIgG2b), portanto, com relação à promoção de produção de isótipos de IgG, H.A. também mostrou-se ligeiramente superior ao DDA-BF;
- Tanto os animais imunizados com DDA-BF/OMVs quanto os animais imunizados com H.A./OMVs foram capazes de desenvolver resposta imunológica celular, evidenciada pelo inchaço das patas provocado pela reação de HTT. Para este parâmetro não houve diferença entre os adjuvantes;
- Soros de camundongos imunizados com DDA-BF/OMVs e H.A./OMVs reconheceram diversos antígenos imunogênicos da cepa homóloga, tanto após uma dose de imunização, quanto após duas doses. Nos animais imunizados com H.A./OMVs houve o reconhecimento de um número maior de antígenos da cepa homóloga que nos animais imunizados com DDA-BF/OMVs. Ademais, ao se analisar a resposta individual, por *Immunoblot* após a segunda dose de imunização, o reconhecimento destes antígenos foi mais homogêneo nos animais imunizados com H.A./OMVs;

- A reatividade cruzada de soros de animais imunizados com DDA-BF/OMVs com antígenos de cepa de heteróloga de *Neisseria meningitidis,* foi um pouco melhor que do soro dos animais imunizados com H.A./OMVs. A Não houve reatividade cruzada do soro de animais imunizados com H.A./OMVs com antígenos da espécie comensal *N. lactamica.* Porém, nos animais imunizados com DDA-BF/OMVs a reatividade cruzada contra antígenos desta espécie isolada de portador pôde ser observada, ainda que fracamente;
- O *pool* de soros de camundongos imunizados com o complexo DDA-BF/OMVs foi capaz de reconhecer fortemente 88%, de um total de 119 de cepas isoladas de pacientes com DM nos anos de 2011/ 2012, enquanto que o *pool* de soros de animais imunizados com H.A./OMVs foi capaz de reconhecer de modo mais fraco, 30% destas, sugerindo, novamente, que o DDA-BF é superior ao H.A. para auxiliar na geração de resposta imunológica cruzada à cepas heterólogas.

REFERÊNCIAS*

ACOUNTURIER, J.; DUPUIS, L.; DEVILLE, S.; ASCARATEIL, S.; GANNE, V. Montaine ISA 720 and 51: new generation of wáter in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. **Expert Rev.**, v. 1, p. 111-118, 2002.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staiing of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in elctron microscope. **J. Mol. Biol.**, v. 8, p. 660-668, 1964.

BARVE, M.; BENDER, J.; SENZER, N.; CUNNINGHAM, C.; GRECO, F. A.; MCCUNE, D. et al. Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-limphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cáncer. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, p. 4418-4425, 2008.

BOISIER, P.; NICOLAS, P.; DJIBO, S.; TAHA, S.; JEANNE, I.; MAINASSARA, H. B. Meningococcal meningitidis: umprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. **Cli. Infec. Dis.**, v. 4, p. 657-663, 2007.

BOVIER, P. A. Epaxal: a virossomal vaccine to prevent hepatitis A infection. **Expert Rev. Vaccine**, v. 7, p. 1141-1150, 2008.

BRANDTZAEG, P. Humoral immune response patterns of human muscosae; inductions and relation to bacterial respiratory tract infections. **J. Infec. Dis.**, v. 165, p. 5167-5176, 1992.

BREWER, J. M. How do aluminium adjuvants work? **Immunol. Lett.**, v. 102, p. 10-15, 2006.

BREWER, J. M.; CONACHER, M.; HUNTER, C. A.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific th2 responses in the absence of IL-4 or IL-3 mediated signaling. **J. Immunol**., v. 163, p. 6448-6454, 1999.

BRICKS, L. F. Doenças meningocócicas- morbidade e epidemiologia nos últimos 20 anos: revisão. **Pediatria**, v. 24, p. 3-4, 2002.

BUDRONI, S.; SIENA, E.; DUNNING HOTOP, J. C.; SEIB, K .L.; SERRUTO, D.; NOFRONI, C.; COMANDUCCI, M.; RILEY, D. R.; DAUGHERTY, S. C.et al. *Neisseria meningitidis* is structed in clades associated with restriction modification systems that module homologous recombination. **Proc. Natl Acad Sci USA**., v. 11, p. 4494-4499, 2011.

CAESAR NM, MYERS KA, FAN X. *Neisseria meningitidis* serogroup B vaccine development. **Microb. Pathog.,** v. 57, p. 33-40 ,2013.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARMONA RIBEIRO, A. M. Biomimetic particles: preparation, characyerization and biomedical applications. **Int. J. Nanomedic**., v. 5, p. 249-259, 2010.

CARMONA RIBEIRO, A. M. Biomemetic particles in drug and vaccine delivery. **J. Liposs. Res**., v. 17, p. 165-172, 2007.

CARMONA RIBEIRO, A. M. Lipid bilayer fragments in disks in drug delivery. **Curr. Med Chem**., v. 13, p. 1359-1370, 2006.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. Bilayer vesicules and lipossomoes as interface agents. **Chem. Soc. Ver.**, v. 30, p. 241-247, 2001.

CARMONA RIBEIRO, A. M. Synthetic amphiphile vesicles. **Chem. Soc. Rev**., v. 21, p. 209-214, 1992.

CARTWRIGHT, K.; NOAH, N.; PETOLA, H. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality and prevention with conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 19, p. 4347-4356, 2001.

CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; PEDRO, L. G.; MARTINS, F. S. **Universidade federal do RJ-CIVES (centro de informação em saúde para viajantes).** 2007.

CHACKERIAN, B.; LOWRY, D. R.; SCHILLER, J. T. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 415-423, 2001.

COHN, A. C.; HARRISON, L. H. **Meningococcal vaccines**: current issues and future strategies. **Drugs,** v. 73, p. 1147-1155, 2013.

COHN, A. C.; MACNEIL, J. R.; HARRISSON, L. H.; HATCHER, C.; et al. Changes in *Neisseria meningitidis* disease epidemiology in the United States, 1998-2007: implications for prevention of meningococcal disease. **J. Infect Dis.**, v. 2, p. 184-191, 2010.

COSTA SILVA, T. A.; da SILVA MEIRA, C.; FRAZZATTI-GALINA, N.; PEREIRA-CHIOCCOLA, N. L. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachzoites cultivated in vero cell mainted in sérum free medium. **Exp. Parasit**., v. 130, p. 463-469, 2012.

CUNHA, T. N. **Estudo da imunogenicidade de antígenos de *Neisseria meningitidis*:** utilização de toxóide como adjuvante, vetorizado em lipossomas, no modelo camundongo. 2008. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). **Gráficos - doença meningocócica**. Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/dm_graficohtm> Acesso em: 03 jan. 2013.

DAVIDSEN, T.; TONJUM, T. Meningococcal genome dynamics. **Nat. Rev. Microbiol**., v. 4, p 11-12, 2006.

DAVIDSEN, J.; ROSENKRANDS, I.; CHRISTENSEN, D.; VANGALA, A.; KIRBY, D.; PERRIE, Y.; AGGER, E. M., ANDERSEN, P. Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecilammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-

dibehenate) – a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. **Bioch. Bio. Acta**, v. 1718, p. 22-31, 2005.

DE GASPARI, E. N. Em busca de uma vacina contra a meningite. **Notícias FAPESP,** São Paulo, SP, 06 out. 1998.

DESOWITZ, R. S.; BARNWELL, J. W. Effect selenium and dimethyl dioctadecyl ammonium bromide on the vaccine-induced immunity of Swiss-Webster mice against malaria (*Plasmodium berghei*). **Infect. Immun.**, v. 27, p. 87-89, 1980.

DIAKUN, K. R.; MARTIN, D. C.; MININNI, T.; SKUSE, J.; ZIEMBIEC, N.; QUATAERT, S. Immunoassay of human *Neisseria meningitidis* serogroup A antibody. **Immunol. Investig.**, v. 26, p. 661-679, 1997.

DOLAN-LIVENGOOD, J. M.; MILLER, Y. K.; MARTIN, L. E.; URWIN, R.; STEPHENS, D. S. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. **J. Infec. Dis.**, v. 187, p. 1616-1618, 2003.

DRANE, D.; MARASKOVSKY, E.; GIBSON, R.; MITCHELL, S.; BARNDEN, M.; MOSKWA, A. Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISOCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. **Hum. Vaccine**, v. 5, p. 151-157, 2009.

DZATA, G. K.; WYCKOFF, J. H.; CONFER, A. W. Immunopotentiation of cattle vaccinated with a soluble *Brucella abortus* antigen with low LPS content: an analysis of cellular and humoral immune responses. **Vet. Microbiol.**, v. 29, p. 15-26, 1991a.

DZATA, G. K.; CONDER, A. W.; WYCKOFF, J. H. The effects of adjuvants on immune responses in cattle infected with *Brucella abortus* antigen. **Vet. Microbiol.**, v. 29, p. 27-48, 1991b.

FLETCHER, L. D.; BERNFIELD, L.; BARNIAK, V.; FARLEY, J. E.; HOWELL, A.; KNAUF, M. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. **Infect Immun.**, v. 72, p. 2088-2100, 2004.

FRASCH, C. E. Development of meningococcal serotyping. In: VEDROS, N. A. (Ed.). **Evolution of meningococcal disease**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987, p. 39-55.

FRASCH, C. E.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotypes antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, p. 504-510, 1985.

FRASCH, C. F.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *N. meningitidis* and a prpposed scheme for designation of serotypes. **Rev. Infect Dis.**, v. 7, p. 504-510, 1985.

FRÉZARD, F. Lipossomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 181-189, 1999.

GALL, D. The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous bases. **Immunology**, v. 11, p. 369-386, 1966.

GARCON, N.; CHOMEZ, P.; VAN MECHELEN, M. Glaxo Smith Kline adjuvant systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. **Expert rev. Vacc.**, v. 6, p. 723-739, 2007.

GARCON, N.; HEPPNER, D. G.; COHEN, J. Development of RTS,S/ASO2: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. **Exp. Rev. Vaccine**, v. 2, p. 231-238, 2003.

GASPAR, E. B.; ROSETTI, A. S.; LINCOPAN, N; DE GASPARI, E. N. *Neisseria lactamica* antigens complexed with a novel cationic adjuvante. Hum. **Vacc. Immunother.**, v. 9, p. 1-10, 2013.

GASPARINI, R.; AMICIZIA, D.; DOMNICH, A.; LAI, P. L.; PANATTO, D. *Neisseria meningitidis* B vaccines: recent advances and possible immunization policies. **Expert Rev. Vaccines**, p. 1-20, 2014

GEOFFROY, M. C.; FLOQUET, S.; METAIS, A.; NASSIF, X.; PELICIC, V. Large-scale of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis. **Genome Res.,** v. 13, p. 391-398, 2003.

GIRARD, M. P.; PREZIOSI, M. P.; AGUADO, M. T.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. **Vaccine**, v. 24, p. 4692-46700, 2006.

GIULIANI, M. M.; ADU-BOBIE, J.; COMANDUCCI, M.; ARICO, B.; SAVINO, S.; SANTINI, L. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 10843- 10849, 2006.

GOLDSCHNEIDER, I,; GOTSCHLICH, E. C.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. **J. Exp. Med.** , v. 1, p. 1367-1384, 1969.

GORDON, W. C.; PRAGUER, M. D.; CARROLL, M. C. The enhancement of humoral and cellular immune responses by dimethyldioctadecylammonium bromide. **Cell. Immun.**, v. 49, p. 329-340, 1980.

GORLA, M. C.; LEMOS, A. P.; SACCHI, C. T.; DE MORAES, J. C.; MILAGRES, L. G. C. Comparison of PorA VR types and porA promoter sequence from *Neisseria meningitidis* B isolated from non-immunised children and vaccine failures immunised with a serogroup B outer membrane protein vaccine. **Vaccine**, v. 21, p. 2871-2876, 2003.

GOTSCHLICH, E. C.; GOLDSCHNEIDER, I.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus IV. Immunogenicity of a group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. **J. Exp. Med.**, v. 1, n. 129, p. 1367-1384, 1969.

GRANOFF, D. M.; BARTOLONI, A.; RICCI, S. Bactericidal monoclonal antibodies that define unique meningococcal B polysacharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. **J. Immunol.**, v. 160, p. 5028-5036, 1998.

GRANOFF, D. M.; MASLANKA, S. E.; CARLONE, G. M.; PLIKAYTIS, B. D.; SANTOS, G. F.; MOKATRIN, A.; RAFF, H. V. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 479-485, 1998.

GRIFANTINI, R.; BARTOLINI, E.; MUZZI, A.; et al. Previosly unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarray. **Nat. Biotechnol.**, v. 20, p. 914-921, 2002.

HARRISON, L. H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 142-164, 2006.

HAYRINEN, J. et al. Antibodies to polysiallic acid and its n- propyl derivative: binding properties and interaction with human embryonal brain glycopeptides. **J. Inf. Dis**., v. 171, p. 1481-1490, 1995.

HIDALGO, N. T. R. **Meningites:** manual de instruções, critérios de confirmação e classificação. Divisão de doenças de transmissão respiratória CVE. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. 2013.

HIGGINS, D.; MARSHALL, J. D.; TRAQUINA, P.; VAN NEST, G.; LIVINGSTON, B. D. Immunostimulatory DNA as a vaccine adjuvant. **Expert Rev. Vacc.**, v. 6, p. 747-759, 2007.

HILGERS, L. A.; SNIPPE, H. DDA as an immunological adjuvant. **Res. Immunol.**, v. 143, p. 494-503, 1992.

HILGERS, L. A. T.; SNIPPE, H.; JANSZE, M.; WILLERS, J. M. N. Route-dependent Immunomodulation: local stimulation by a surfactant and systemic stimulation by a polyanion. **Int. Arch. Allergy**, v. 79, p. 392-396, 1986.

HILL, D. J. et al. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. **Clin. Sci.**, v. 118, p. 547-564, 2006

HOLST, J.; OSTER, P.; ARNOLD, R.; TATLEY, M. V.; NAESS, L. M.; AABERGE, I. S.; ALLOWAY, Y.; McNICHOLAS, A.; O'HALLAHAN, J.; ROSEQVIST, E.; BLACK, S. Vaccines against meningococcal serpgroup B disease containing outer membrane vesicles (OMVS). **Hum. Vacc. Immunother.**, v. 9, p. 1241-1253, 2013.

HOLST, J.; NOKLEBY, H.; BETTINGER, J. A. Considerations for controlling invasive meningococcal disease in high income countries. **Vaccine**, v. 30, p. B57-62, 2012.

HOLST, J.; MARTIN, D.; ARNOLD, R.; HUERGO, C. C.; OSTER, P.; O'HALLAHAN, J.; RONQUEVIST, E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 24, n. 27, p. B3-12, 2009.

HOLST, J.; OSTER, P.; ARNOLD, R.; TATLEY, M. V.; NAESS, L. M.; AABERGE, I. S.; GALLOWAY, Y.; McNICHOLAS, A.; O'HALLAHAN, J.; ROSENQVIST, E., BLACK, S. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV lessons from past programs and implications for the future. **Hum. Vacc. Immun.**, v. 6, p. 1241-1253, 2013.

HOWELL-ADAMS, B.; SEIFERT, H. S. Molecular models accouting for the gene conversión reactions mediating gonococcal pilin antigenic variation. **Mol. Microbiol.**, v. 37, p. 1146-1158, 2000.

JACKSON, C.; LENNON, D. R.; SOTUTU, V. T.; YAN, J.; STEWART, J. M.; REID, S. Phase II meningococcal B vesicle vaccine trial in New Zealand infants. **Arch. Dis. Child**, v. 10, p. 745-751, 2009.

JOHANSSON, L.; RYTKONEN, A.; BERGMAN, P.; ALBIGER, B.; KALLSTROM, H.; HOKFELT, T.; AGEBERTH, B.; CATTANEO, R.; JONSSON, A. B. CD46 in meningococcal disease. **Science**, v. 301, p. 373-375, 2003.

JONES, H. E.; URONEN-HANSSON, H.; CALLARD, R. E.; KLEIN, N.; DIXON. G. L.The differential response of human dendritic cells to live and killed *Neisseria meningitidis*. **Cell. Microbiol.**, v. 9, p. 2856-2869, 2007.

KATZ, D.; LEHRER, S.; GALAN, O.; LACHMI, B.; COHEN, S. Adjuvant effects of dimethyl – dioctadecyl – amonium bromide, complete Freud's adjuvant and aluminium hydroxide on neutralizing antibody, antibody-isotipe and delayed type hipersensitivity responses to Semliki Forest virus in mice. **FEMS Microbiol. Immunol.**, v. 76, p. 305-320, 1991.

KENNEY, R. T.; EDELMAN, R. Survey of human-use adjuvants**. Expert Rev. Vaccines**, v. 2, p. 167-188, 2003.

KOLB-MAURER, A.; UNKMEIR, A.; KAMMERER, U. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. **Infect. Immun**., v. 69, p. 6912-6922, 2001.

KORSHOLM, K. S.; AGGER, E. M.; FOGED, C.; CHRISTENSEN, P.; DIETRICH, J.; ANDERSEN, C. S.; GEISEU, C.; ANDERSEN, P. The adjuvant mechanism of cationic dimethldioctadecylammonium liposomes. **Immunology**, v. 121, p. 216-226, 2007.

KRAAIJEVELD, C. A.; BERNAISSA-TROUW, B.; HARMSEN, M.; SNIPPE, H. Delayed type hypersensitivity against Semliki Forest virus in mice: local transfer of delayed type hypersensitivity with thioglycollate induced peritoneal exudate cells. **Int. Arch. Allergy**, v. 73, p. 342-346, 1984.

KRIZ, P.; GIORGINI, D.; MUSILEK, M.; LARRIBE, M.; TAHA, M. K. Microevolution through DNA exchange among strains of *Neisseria meningitidis* isolated during an outbreak in the Czech Republic. Res. **Microbiol.**, v.150, p. 273-280, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBRECHT, B. N.; KOOL, M.; WILLART, M. A.; HAMMAD, H .Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, p. 23-29, 2009.

LEMOS, A. P.; BRANDAO, A. P.; GORLA, M. C.; PAIVA, M. V.; SIMONSEN, V.; MELLES, C. E. Phenotypic characterization of Neisseria meningitidis strains isolated from invasive disease in Brazil from 1990 to 2001. **J Med Microbiol**., v. 55, p. 751-757, 2006.

LEPOW, M. L.; PERKINS, B. A.; HUGHES, P. A.; POOLMAN, J. T. Meningococcal vaccines. In: PLOTKIN, A. S.; ORENSTEIN, W. A. (Ed.). **Vaccines**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 711-727.

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response.**Vaccine**, v. 31, p. 25-36, 2010.

LINCOPAN, N.; ESPINOLA, N. M.; VAZ, A. J.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic supported lipid bilayers for antigen presentation. **Int. J. Pharm**., v. 340, p. 216-222, 2007.

LINCOPAN, N.; ESPINDOLA, N. M.; VAZ, A.J.; da COSTA, M. H.; FAQUIM-MAURO, E.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: preparation, characterization and activity in vivo. **Vaccine**, v. 27, p. 5760-5771, 2009

LINDBLAD, E. B. Aluminium, compounds for use in vaccines. **Immunol.Cell Biol**., v. 82, p. 497-505, 2004

MACDONALD, N. E.; HALPERIN, S. A.; LAW, B. J.; FORREST, B.; DANZIG, L. E.; GRANOFF, D. M. Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 280, p. 1685-1689, 1998.

MANDICO, G.; WELSCH, J. A.; LEWIS, L. A.; McNAUGHTON, A.; PERLMAN, D. A.; COSTELLO, C. E. The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. **J. Immunol.**, v. 177, p. 501-510, 2006.

MASHBURN, W. L.; MCLEAN, R. J.; WHITELEY, M. Gram – negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. **Geobiology,** v. 6, p. 214-216, 2008.

MASIGNANI, V.; COMANDUCCI, M.; GIULIANI, M. M.; et al. Vaccination against Neiseria meningitidis using three variants of the lipoprotein GNA 1870. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 789-799, 2003.

MAZUMDAR, T.; ANAM, K.; ALI, N. A mixed Th1/ Th2 response elicited by liposomal formulation of leishmania vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, v. 22, p. 1162-1171, 2004.

MCGUINNESS, B. T.; CLARKE, I. N.; LAMBDEN, P. R.; BARLOW, A. K.; POOLMAN, J. T.; JONES, D. M. Point mutation in meningococcal por A gene associated with increased endemic disease. **Lancet**, v. 337, p. 514-517, 1991.

MCGUINNESS, B. T.; LAMBDEN, P. R.; HECKELS, J. E. Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implications for subtype definition and molecular epidemiology. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 505-514, 1993.

MCNICHOLAS, A.; GALLOWAY, Y.; STEHR-GREEN, P.; REID, S.; RADKE, S.; SEXTON, K. Post-marketing safety monitoring of a new group B meningococcal vaccine in New Zealand. **Hum. Vaccine**, v. 3, p. 196-204, 2007.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immun. Rev.**, v. 173, p. 89-97, 2000.

MEYER, T. F. Pathogenic neisseriae model of bacterial virulence and genetic flexibility. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 274, n. 2, p. 135-154, 1990.

MILLER, E.; SALISBURY, D.; RAMSAY, M. Planing, registration and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a sucess story. **Vaccine**, v. 20, p. S58-67, 2001.

MOORE, P. S. Meningococcal meningitidis in Sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process. **Clin. Infec. Dis.**, v. 14, p. 515-525, 1992.

MOOSER, C.; AMACKER, M.; ZURBRIGGEN, R. Influenza virossomes as a vaccine adjuvant and carrier system. **Exp. Rev.,** v. 10, p. 437-446, 2011.

MORAES, J. C.; BARATA, R. B. Meningococcal disease in Sao Paulo, Brazil, in the 20th century: epidemiological characteristics. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, p. 1458-1471, 2005.

MORAES, J. C.; PERKINS, B. A.; CAMARGO, M. C.; HIDALGO, N. T.; BARBOSA, H. A.; SACCHI, C. T. Protective eficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. **Lancet**, v. 340, p. 1074-1078, 1992.

MOREFIELD, G. L.; SOKOLOVSKA, A.; JIANG, D.; HOGENESSCH, H.; ROBINSON, J. P.; HEM, S. L. Role of aluminium-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. **Vaccine**, v. 23, p. 1588-1595, 2005.

MORLEY, S. L.; POLLARD, A. J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? **Vaccine**, v. 20, p. 666-687, 2002.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

NEWMAN, M. J.; WU, J. Y.; GARDNER, B. H.; ANDERSON, C. A.; KENSIL, C. R.; RECCHIA, J. Induction of cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses specific for HIV-1 gp 120 using saponin adjuvant (QS-21) supplemented subunit vaccine formulations. **Vaccine**, v. 15, p. 1001-1007, 1997.

NICHOLLS, E. F.; MADERA, L., HANCOCOCK, R. E. W. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. **Ann. N. Y. Aad. Sci.**, v. 1213, p. 46-61, 2010.

O'HALLAHAN, J.; LENNON, D.; OSTER, P. The strategy to control New Zealand's epidemic of group B meningococcal disease. **Pediatr. Infect Dis. J.**, v. 23, p. S293-298, 2004.

OGRA, P. L.; MC GHEE, J. M. (Ed.). **Mucosal vaccines**. San Diego, California: Academic Press, 1996. p. 3-13.

OLIVER, J. K.; REDDIN, K. M.; BRACEGIRDLE, P.; HUDSON, M. J.; BORROW, R.; FEAVERS, I. M. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. **Infec. Immun.**, v. 70, p. 3621-3626, 2002.

PADRON, S. F.; GILL, V. C.; DIAZ, E. M. F.; VALDESPINO, E. D. C.; GOTERA, N. G. Cuban meningococcal BC vaccine: experiences and contribution from 20 years of application. **Medic. Rev.**, v. 9, p. 16-22, 2007.

PARSONS, N. J.; ANDRADE, J. R.; PATEL, P. V.; COLE, J. A.; SMITH, H. Sialylation of lipopolysaccharide and loss of absorption of bacterial antibody during conversión of gonococci to serum resistance by cytidine 5'- monophospho – N – acetyl neuraminic acid. **Microb. Pathog.**, v. 7, p. 63- 72, 1989.

PANATTO, D.; AMICIZIA, D.; LAI, L. P.; GASPARINI, R. *Neisseria meningitidis* B vacines. **Exp. Ver. Vaccines**, v. 9, p. 1337-1351, 2011.

PEARSE, M. J.; DRANE, D. ISOCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, p. 465-474, 2005.

PODDA, A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with MF59-adjuvanted vaccine. **Vaccine**, v. 19, p. 2673-2680. 2001.

POLLARD, A. J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis.* **Vaccine**, v. 19, p.1327-1346, 2001.

POLLARD, A. J.; LEVIN, M. Production of low-avidity antibody by infants after infection with serogroup B meningococci. **Lancet**, v. 356, p. 2065-2066, 2000.

POOLMAN, J. T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect. Agents. Dis.**, v. 4, p. 13-28, 1995.

POOLMAN, J. T.; HOPMAN, C. T.; ZANEN, H. C. Colony variants of *Neisseria meningitidis* strain 2996 (B:2b:P1.2): influence of class-5 outer membrane proteins and lipopolysaccharides. **J. Med. Microbiol.**, v. 19, n. 2, p. 203-209, 1985.

PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Universal protein vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B, *Streptococcus pneumoniae* and influenza. **Hum. Vaccines**, v. 7, p. 905-912, 2011.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. O.; MORGADO, R. Novos sistemas terapêuticos. In: PRISTA, L.N.; ALVES, A. O.; MORGADO, R. (Ed.). **Técnica farmacéutica e farmacia galénica.** 3. ed. Lisboa: Fundação Caloustre Gulbenkian, 1981. v. 3, p. 2055-2083.

RAPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, p. 2688-2691, 2001.

READ, R. C.; FOX, A. J.; MILLER, K.; GRAY, T.; JONES, N.; BORROWS, R. Experimental infection of human nasal mucosal explants with *N.meningitidis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, p. 353-361, 1995.

RECK, R. A. **Quaternary ammonium compounds in Encyclopedia of chemical technology.** New York: John Wiley and Sons, 1983. v. 19, p. 521-531.

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**., v. 30, p. 23-32, 2009.

RIJIKE, E. O.; LOEFFEN, A. H. C; LUTTICKEN, D. The use of lipid amines as immunopotentiators for viral vaccines. In: BIZZINI, B.; BONMASSAR, E. **Advances in immunomodulation**. Roma-Milan: Phytagora Press, 1988. p. 433-443.

RODRIGUEZ, A. P.; DICKINSON, F.; BALLY, A.; MARTINEZ, R. The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p. 433-440, 1999.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E. A.; BJUNE, G.; AASE, A.; LEHMANN, A. K. Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. **Dev. Biol. Stand.**, v. 92, p. 323-333, 1998.

ROSENSTEIN, N. E.; PERKINS, B. A.; STEPHENS, D. S.; POPOVIC, T.; HUGHES, J. M. Meningococcal disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1378-1388, 2001.

ROUPHAEL, N. G., STEPHENS, D. S. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. **Methods. Mol. Biol.**, v. 799, p. 1-20, 2012.

SINGH, M.; KAZZAZ, J.; UGOZZOLI, M.; MAHYALA, P.; CHESKO, J.; O'HAGAN, D. T. Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. **Curr. Drug Deliv**., v. 3, p. 115-120, 2006.

SKEIKY, Y. A.; ALDERSON, M. R.; OVENDALE, P. J.; GUDERIAN, J. A.; BRANDT, L.; DILLON, D. C. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. **J. Immunol.**, v. 172, p. 7618-7628, 2004.

SKENE, C. D.; SUTTON, P. Saponin- adjuvanted particulate vaccines for clinical use. **Methods**, v. 40, p. 53-59, 2006.

SOUZA, A. L.; SEGURO, A. C. Two centuries of meningococcal infection: from Vieusseux to the cellular and molecular basis of disease. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 1313-1321, 2008.

STEPHENS, D. S.; WHITNEY, A. M.; MELLY, M. A.; HOFFMAN, L. H.; FARLEY, M. M.; FRASCH, C. E. Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *N. meningitidis.* **Infect. Dis.**, v. 51, p. 579-585, 1986.

STEPHENS, D. S.; FARLEY, M. M. Pathogenic events during infection of the humam nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. **Rev. Infect. Dis.**, v.13, n.1, p.22-33, 1991.

STEPHENS, D. S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia and *Neisseria meningitidis*. **Lancet**, v. 369, p. 2196-2210, 2007.

SWARTLEY, J. S.; MARFIN, A. A.; EDUPUGNATI, S.; LIU, L. J. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 271-276, 1997.

SWARTLEY, J. S.; MARFIN, A. A.; EDUPUGANTI, S.; LIU, L. J.; CIESLAK, P.; PERKINS, B. Capsule switiching of *Neisseria meningitidis.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 271-276, 1997.

TONDELLA, M. L.; POPOVIC, T.; ROSENSTEIN, N. E.; LAKE, D. B.; CARLONE, G. M.; MAYER, L. W. Distribuition of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3323-3328, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TROTTER, C. L.; ANDREWS, N. J.; KACZMARSKI, E. B.; MILLER, E.; RAMSAY, M. E. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. **Lancet**, v. 364, p. 365-367, 2004.

TUNES, C. L. **Imunização nasal em coelhos com *Neisseria lactamica*:** importância dos antígenos de reatividade cruzada. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TZENG, Y. L.; STEPHENS, D. S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microb. Infection**, v. 2, p. 687-700, 2000.

UCHIDA, T. STX-liposome conjugates as candidate vaccines. **Drugs Today (Barc.),** v. 39, n. 9, p. 673-693, 2003.

VAN DER ENDE, A.; HOPMAN, C. T.; DANKERT, J. Multiple mechanisms of phase variation of por A in *Neisseria meningitidis*. **Infec. Immun.**, v. 68, p. 6685-6690, 2000.

VAN DER ENDE, A.; HOPMAN, C. T.; DANKERT, J. Deletion of por A by recombination between clusters of repetitive extragenic palindromic sequences in *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun**., v. 67, p. 2928-2934, 1999.

VAN DER VOORT, E. R.; VAN DIJIEN, H.; KUIPERS, B.; VAN DER BIEZEN, J. VAN DER LEY, P.; MEYLIS, J. Human B- and T- cell responses after immunization with a hexavalent PorA meningococcal OMVS vaccine. **Infec. Immun.**, v. 12, p. 5184-5190, 1997.

VAN ROUTE, A. J.; SNIPPE, H.; PEULEN, G. T. M.; WILLERS, J. M. N. Characterization of immunogenic properties of haptenated liposomal model membranes in mice – II. Introduction of delayed type hipersensitivity. **Immunology**, v. 42, p. 165-173, 1981.

VERMONT, C. L.; VAN DIJIKEN, H. H.; VAN LIMPT, C. J.; VAN ALPHEN, L.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P. Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. **Infec. Immun.**, v. 70, p. 584-590, 2002.

VERONESI, R.; CORREA, A.; ALTERIO, D. Single dose immunization against tetanus. Promising results in human trials. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 12, p. 46-54, 1970.

VOGEL, U.; CLAUS, H.; HEINZE, G.; FROSCH, M. Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistence of serogroup B and C meningococcal disease isolates. **Infect. Immun.**, v.67, p. 954-957, 1999.

WILLERS, J. M. N.; HOFHUIS, F. M. A.; VAN DER MEER, C. Prologation of acquired cellular resistance to *Listeria monocytogenes*. **Immunology**, v. 46, p. 787-792, 1982.

XIANG, S. D.; SCHOLZEN, A.; MINIGO, G.; DAVID, C.; APOSTOLOPOULOS, V. MOTTRAM, P. L.; PLEBANSKI, M. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? **Methods**, v. 40, p. 1-9, 2006.

ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T.; MAIDEN, M. C. J. Meningococcal serogroup B vaccines: will they live up to spectations? **Expert Rev. Vacc.**, v. 10, p. 559-561, 2011.

APÊNDICE - Relação de cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de pacientes, utilizadas na técnica de Dot-ELISA

IAL	ANO	ORIGEM	UF	IDENTIF	GRUPO	SOROTIPO	SUBTIPO
N.03	2011	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.05	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.06	2011	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.08	2011	SG	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.15	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	Y	19,10	P1.9
N.18	2011	LCR	BA	*N meningitidis*	B	4,7	P1.22-1,16
N.22	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.19
N.26	2011	SG	DF	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.30	2011	LCR	BA	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.32	2011	LCR	BA	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.33	2011	LCR	PE	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.35	2011	SG	PE	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.36	2011	LCR	PE	*N meningitidis*	C	2b	P1.14-6
N.37	2011	SG	BA	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.39	2011	LCR	BA	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.41	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	B	19,7	P1.14
N.56	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19
N.60	2011	LCR	RN	*N meningitidis*	B	4,7	P1.7,1
N.61	2011	LCR	RN	*N meningitidis*	B	4,7	P1.7,1
N.63	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.5
N.67	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	21	nt
N.68	2011	LCR	AC	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.70	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.14-6

N.74	2011	LCR	RS	*N meningitidis*	W135	2a	P1.5,2
N.75	2011	LCR	RS	*N meningitidis*	B	15	P1.16
N.77	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	B	19,1	P1.5,2
N.82	2011	SG	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.85	2011	LCR	PR	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.95	2011	LCR	MA	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.101	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	W135	2b	P1.5,2
N.149	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	4,7	P1.19,15
N.155	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	2b	nt
N.180	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	Y	22	P1.3
N.184	2011	SG	PR	*N meningitidis*	B	23	P1.14-6
N.186	2011	LCR	AM	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.187	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.9
N.188	2011	LCR	SC	*N meningitidis*	B	15	P1.16
N.189	2011	LCR	SC	*N meningitidis*	B	19	P1.22-1,14
N.193	2011	SG	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.205	2011	LCR	PE	*N meningitidis*	Y	17,7	P1.5
N.210	2011	SG	BA	*N meningitidis*	W135	2b	P1.5,2
N.219	2011	LCR	GO	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.220	2011	LCR	GO	*N meningitidis*	C	4,7	P1.19,15
N.225	2011	LCR	GO	*N meningitidis*	W135	2a	P1.5
N.267	2011	SG	ES	*N meningitidis*	Y	22	P1.3
N.357	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	Y	19	P1.5
N.458	2011	LCR	BA	*N meningitidis*	W135	2b	P1.2
N.472	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.552	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.553	2011	SG	SP	*N meningitidis*	C	2a	P1.5

N.554	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	2b	P1.14-6
N.556	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.601	2011	LCR	BA	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.604	2011	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.606	2011	LCR	PR	*N meningitidis*	C	23	P1.3
N.609	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.611	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.617	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.669	2011	LCR	SP	*N meningitidis*	C	2a	P1.14-6
N.01	2012	SG	SP	*N meningitidis*	Y	22	P1.3
N.04	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	B	19,1	nt
N.08	2012	LCR	PR	*N meningitidis*	C	2b	P1.14-6
N.10	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	Y	19	nt
N.11	2012	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.12	2012	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.14	2012	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.15	2012	LCR	RS	*N meningitidis*	W135	2a	P1.5,2
N.16	2012	LCR	RS	*N meningitidis*	B	19,7	nt
N.17	2012	SG	SP	*N meningitidis*	B	19,1	nt
N.19	2012	SG	PR	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.20	2012	SG	CE	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.23	2012	SG	CE	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.26	2012	LCR	CE	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.29	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	B	19,1	nt
N.30	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.33	2012	LCR	ES	*N meningitidis*	B	4,1	P1.16
N.34	2012	SG	SP	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15

N.35	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	4,7	P1.19,15
N.37	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.39	2012	SG	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.40	2012	SG	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.41	2012	LCR	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.42	2012	LCR	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.43	2012	LCR	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.44	2012	LCR	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.45	2012	LCR	MG	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.47	2012	LCR	MG	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.52	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	B	4,7	Nt
N.54	2012	LCR	PE	*N meningitidis*	B	4,7	P1.1
N.62	2012	LCR	DF	*N meningitidis*	B	23	P1.14-6
N.63	2012	SG	DF	*N meningitidis*	W135	2a	P1.2
N.64	2012	LCR	DF	*N meningitidis*	W135	2a	P1.5,2
N.65	2012	LCR	DF	*N meningitidis*	B	4,7	P1.19,15
N.72	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.76	2012	SG	BA	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.85	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	Y	22	P1.3
N.89	2012	LCR	BA	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.90	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.99	2012	SG	BA	*N meningitidis*	W135	2b	P1.2
N.101	2012	LCR	BA	*N meningitidis*	B	4,10	P1.9
N.104	2012	SG	SP	*N meningitidis*	C	2a	P1.5
N.105	2012	SG	SP	*N meningitidis*	B	19,1	P1.19
N.106	2012	LCR	RN	*N meningitidis*	B	19,1	Nt
N.107	2012	SG	ES	*N meningitidis*	B	1	Nt

N.109	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.110	2012	LCR	BA	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.111	2012	LCR	BA	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.112	2012	LCR	BA	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.115	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.5
N.116	2012	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.117	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.118	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.119	2012	SG	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.120	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	C	23	P1.14-6
N.123	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	W135	2b	P1.5,2
N.125	2012	LCR	SP	*N meningitidis*	Y	22	P1.3
N.126	2012	LCR	PE	*N meningitidis*	B	4,7	P1.1
N.134	2012	LCR	RN	*N meningitidis*	B	19	Nt
N.220	2012	SG	SP	*N meningitidis*	Y	nt	Nt