

MARIA VERÔNICA DOS SANTOS

**IMUNIZAÇÃO NASAL COM ANTÍGENOS DE
MEMBRANA EXTERNA DE *NEISSERIA MENINGITIDIS B*
SELECIONADOS PARA A MAIOR EXPRESSÃO
DO IMUNOTIPO DE LPS 3,7,9 COM ANTICORPOS
MONOCLONAIS E *BORDETELLA PERTUSSIS* COMO
ADJUVANTE EM CAMUNDONGOS NEONATOS**

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

São Paulo
2008

MARIA VERÔNICA DOS SANTOS

**IMUNIZAÇÃO NASAL COM ANTÍGENOS DE
MEMBRANA EXTERNA DE *NEISSERIA MENINGITIDIS B*
SELECIONADOS PARA A MAIOR EXPRESSÃO
DO IMUNOTIPO DE LPS 3,7,9 COM ANTICORPOS
MONOCLONAIS E *BORDETELLA PERTUSSIS* COMO
ADJUVANTE EM CAMUNDONGOS NEONATOS**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Natal De Gaspari

São Paulo
2008

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

Santos, Maria Verônica dos.

Imunização nasal com antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B selecionados para a maior expressão do imunotipo de LPS 3,7,9 com anticorpos monoclonais e *Bordetella pertussis* como adjuvante em camundongos neonatos / Maria Verônica dos Santos. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Elizabeth Natal de Gaspari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Imunologia aplicada.

Versão do título para o inglês: Nasal immunization with outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* B selected for the highest expression of the immunotype of LPS 3,7,9 with monoclonal antibodies and *Bordetella pertussis* as adjuvants in neonates mice.

Descritores: 1. *Neisseria meningitidis* 2. Lipopolissacarídeo.(LPS) 3. Imunização nasal 4. Complexo de membrana externa 5. Camundongos 6. *Bordetella pertussis* I. De Gaspari, Elizabeth Natal II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB068/2008

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

Candidato(a): Maria Verônica dos Santos.

Título da Dissertação: Imunização nasal com antígenos de membrana externa de
Neisseria meningitidis B selecionados para a maior expressão do imunotipo de LPS 3,7,9 com anticorpos monoclonais e *Bordetella pertussis* como adjuvante em camundongos neonatos.

Orientador(a): Elizabeth Natal de Gaspari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,**

em sessão pública realizada a/...../.....,

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

Examinador(a): Assinatura:
.....

Nome:
.....

Instituição:
.....

Examinador(a): Assinatura:
.....

Nome:
.....

Instituição:
.....

Presidente: Assinatura:
.....

Nome:
.....

Instituição:
.....

RESUMO

SANTOS, M.V. dos. **Imunização nasal com antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B selecionados para a maior expressão do imunotipo de LPS 3,7,9 com anticorpos monoclonais e *Bordetella pertussis* como adjuvante em camundongos neonatos.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O habitat natural da *Neisseria meningitidis* é a nasofaringe humana e a transmissão da bactéria é por contato direto ou por inalação de partículas durante a fase de transmissão. *N. meningitidis* é uma bactéria Gram-negativa responsável por uma significativa mortalidade em todo o mundo. Embora existam vacinas polissacárides contra os sorogrupos A, C, W135 e Y, não há uma vacina adequada para crianças menores de 4 anos para o sorogrupo B. Estudos estão sendo direcionadas para pesquisa de antígenos vacinais que são derivados das proteínas de membrana externa (NOMV). Entretanto vacinas baseadas em NOMV são consideradas pouco imunogênicas, fazendo com que o uso de adjuvantes seja necessário. Este estudo investiga a imunogenicidade da NOMV de *N. meningitidis* administrada pela via intranasal/intramuscular em camundongos neonatos BALB/c, usando proteína de membrana externa (NOMC) obtido de uma cepa epidêmica de *N. meningitidis* B:4:P1:15. As cepas usadas para imunização dos camundongos foram selecionadas por *colony-blot*, usando anticorpo monoclonal anti L3,7,9 para maior expressão do LPS contra o imunotipo L3,7,9 presente na cepa (B:4:P1:15 3,7,9⁺). Como adjuvantes de mucosa foram utilizados *Bordetella pertussis* (células íntegras) ou sobrenadante de cultura com 48 horas. O soro dos camundongos imunizados foram analisados pelo método de ELISA à fim de se comparar os diferentes adjuvantes utilizados. O índice de avidéz também foi determinado. IgG e IgM foram detectados nos soros dos camundongos após imunização, com índices de intermediária e alta avidéz. Todos os adjuvantes foram capazes de aumentar a resposta imune contra NOMV de *N. meningitidis*. A via intranasal foi adequada para sensibilizar as células do sistema imune que foram rapidamente estimuladas pela via intramuscular usando os adjuvantes utilizados na presente

investigação. Dados sugerem que o estudo da NOMV é importante na indução da imunidade de mucosa para *N. meningitidis* B, e que a qualidade e magnitude da resposta imune gerada pelas vacinas de mucosa são influenciadas tanto pelo adjuvante como pelo antígeno. Concluímos que NOMV juntamente com adjuvantes de mucosa tem considerável potencial no desenvolvimento de vacinas contra o meningococo do sorogrupo B.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*, Lipopolissacaríde (LPS), Imunização nasal, Complexo de membrana externa(NOMC), Camundongos neonatos, *Bordetella pertussis*.

ABSTRACT

SANTOS, M. V. dos. **Nasal immunization with outer membrane antigens with a high expression of LPS immunotype L3,7,9 with monoclonal antibodies and *Bordetella pertussis* as adjuvant in neonates mice.** 2008. 69 f. Dissertação (Master Thesis) - Instituto Butantan /IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The natural habitat of *Neisseria meningitidis* is the human nasopharynx and the bacterium is transmitted by direct mouth-to-mouth contact or by the excretion and inhalation of mucous particles during close contact. *N meningitidis* is a Gram-negative bacterium responsible for significant mortality worldwide. While effective polysaccharides-based vaccines exist against serogroups A, C, W135, and Y, no similar vaccine is suitable for children under 4 years against disease caused by serogroup B strains. Current studies are searching vaccinal antigens that are derived from the native outer membrane (NOMV). However, vaccines based on NOMV are considered weak, being necessary the use of adjuvants. This study investigated the immunogenicity of intranasally /intramuscularly administered NOMV of *N.meningitidis* in an neonates BALB/c mice by native outer membrane complex (NOMC) obtained from a epidemic strain of *N. meningitidis* B:4:P1.15. The strains used for immunization of mice were selected through colony-blot, using anti L3,7,9 monoclonal antibodies, for the highest expression of the LPS of immunotypes, (B:4:P1:15 L9 \uparrow). As mucosal adjuvants we used *Bordetella pertussis* (whole cells) or culture supernatant of this bacteria after 48h of bacteria crescimento followed by an intramuscular dose of the same protein adsorbed onto , *Bordetella pertussis* (whole cells) , culture supernatant of 48h de crescimento . Sera of immunized mice were evaluated by ELISA in order to compared the different adjuvants used. We also verified the avidity index of them. Expressive titers of IgG and IgM were detected in the serum of mice after the immunization, with avidity indexes that from intermediary to high. All adjuvants were capable to increase the immune response against NOMV of *N.meningitidis* in a homologous prime/boost schedule used. The intranasal route was capable to sensitize the cells of the

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o trato respiratório superior humano é colonizado por diversos microorganismos. Contudo, alguns desses microorganismos são responsáveis por infecções que se iniciam nas vias respiratórias, superam as defesas do sistema imunológico e provocam enfermidades como pneumonias, amidalites, sinusites, septicemias e meningites, além de outras mais raras e invasivas, como meningoencefalites e choques septicêmicos. Dentre os microorganismos que produzem esse tipo de infecção encontram-se as bactérias *Streptococcus pneumoniae* (ou pneumococo), *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* (ou meningococo).

N. meningitidis são bactérias gram-negativas, apresentam-se aos em pares na forma de diplococos, e são capazes de se multiplicarem fora das células do hospedeiro. Ao serem cultivadas em placas, as colônias formadas são transparentes, não pigmentadas, convexas, não hemolíticas, com aproximadamente 0,6 a 1µm de diâmetro. A identificação bacteriológica é feita através do plaqueamento em ágar contendo açúcares, entre os quais pode-se citar: dextrose, maltose, levulose e lactose. O uso da maltose e dextrose é uma propriedade característica do meningococo, sendo portanto utilizado para diferenciá-lo de outros microorganismos gram-negativos que não utilizam esses açúcares. O microorganismo apresenta um bom crescimento nos meios de cultura, Müller Hinton, Thayer-Martin e Müller Hinton-chocolate a uma atmosfera de CO₂ e a uma temperatura de 37° C (HOLT et al., 1994).

O microorganismo é comum na mucosa do trato respiratório superior humano e sua transmissão ocorre através do contato de pessoas saudáveis com secreções nasofaríngeas de pessoas portadoras assintomáticas (RAFF et al., 1988; DEVI et al., 1991).

N. meningitidis tem um reconhecido papel em casos esporádicos e epidêmicos de meningites em todo o mundo. Na atualidade, a meningite meningocócica tem despertado atenção pela mudança no seu padrão e aumento da incidência em várias partes do mundo, onde não havia índice significativo de incidência (PELTOLA, 1998; TZENG e STEPHENS, 2000).

Essa doença ainda continua sendo um problema na África, e ao mesmo tempo mortes causadas pela doença têm surgido nos últimos dez anos na América do Sul, no sudeste Africano, na Europa e na Ásia. No continente africano, na região do sub-Sahara situa-se o cinturão da meningite, que abrange desde o Senegal até a Etiópia na costa leste, onde a taxa de incidência da doença chega a 1% da população.

O aumento da incidência da doença na população está relacionada a susceptibilidade humana, resultante principalmente da deficiência dos componentes do complemento, de células com funções opsonofagocítica e ainda, a fatores ambientais. Pode-se citar ainda a mudança de carga e de hidrofobicidade da mucosa nasal, causada principalmente por fumo ou infecções pré-estabelecidas, que torna mais susceptível a infecções pelo meningococo (STEPHENS et al., 1999).

Os estudos epidemiológicos demonstram a existência de casos esporádicos durante todo o ano, sendo estes mais freqüentes nos meses de outono/inverno devido as condições ambientais. A aglomeração intradomiciliar favorece a transmissão, tanto que a freqüência é alta em alojamentos militares, creches e internatos. É primordialmente uma doença de criança e adultos jovens. Estudos mostram que o meningococo raramente causa infecção assintomática em crianças menores de quatro anos. Esta prevalência aumenta com a idade atingindo cerca de 5 % dos indivíduos de 14 a 18 anos (PELTOLA, 1988).

O principal fator de virulência é a presença do polissacarídeo capsular que classifica a espécie em 12 diferentes sorogrupos: A, B, C, 29E, H,K, I, L, X, Y, W135 e Z. Os sorogrupos envolvidos em casos epidêmicos são A, B, C, Y e W135 (PELTOLA, 1988).

Neisseria meningitidis do sorogrupo B é a responsável pela septicemia fulminante e é a causa comum de meningite piogênica. Em conjunto com surtos esporádicos, as grandes epidemias de doença meningocócica do sorogrupo B ocorrem em muitas partes do mundo, portanto, o desenvolvimento de uma vacina contra *N. meningitidis* do soro grupo B constitui alta prioridade mundial. Diferente de outros sorogrupos em que os polissacárides da cápsula

constituem uma vacina eficaz, a cápsula do sorogrupo B é pouco imunogênica em humanos. Para o preparo de novas formulações vacinais, é dada ênfase ao sistema de imunização de mucosas.

Durante seu crescimento a bactéria libera vesículas para o meio externo, as quais são formadas por evaginações da membrana externa e são constituídas de proteínas e lipopolissacarídeos (LPS) (FRASCH et al., 1986; MEYER et al., 1994). Distinguem-se em quatro grupos as estruturas de superfície presentes na parede bacteriana: cápsula polissacarídica, proteínas de membrana externa, LPS e fimbrias (MEYER et al., 1994). Essas estruturas são a base para classificação fenotípica do microrganismo, sendo os principais antígenos envolvidos na resposta imune do hospedeiro.

As proteínas de membrana externa são divididas em cinco classes de acordo com o mapeamento protéico e o peso molecular, o qual pode variar de 44-47 kDa para as proteínas de classe 1, 26-30 kDa para a proteína de classe 5 (FRASCH et al., 1986). As proteínas da classe 2 ou 3 não se apresentam simultaneamente em uma mesma cepa e são a base para a classificação da bactéria em sorotipo 37kDa. As proteínas da classe 1 determinam o subtipo (FRASCH et al., 1985). A classificação do meningococo em imunotipo é baseada na composição do lipopolissacarídeo, sendo que uma bactéria pode expressar diferentes imunotipos. Atualmente, reconhecem-se 12 imunotipos, sendo que L1 a L8 estão associados aos sorogrupos B e C e L10 – L12 com o sorogrupo A (VERHEUL et al., 1993 ; ZOLLINGER et al., 1991a) . Dessa forma pode-se classificar o meningococo em: *N. meningitidis* B:4:P1.15, L3,7,9 onde (B) é o sorogrupo, (4) é o sorotipo, (P1.15) é o subtipo e (L3,7,9) o imunotipo.

Atualmente, são descritos mais de 20 sorotipos e subtipos reconhecidos por anticorpos monoclonais (MAbs) (WEDEGE et al., 1990). As epidemias de doença meningocócica (DM) causadas por *N.meningitidis* B e C têm sido descritas em diversos Estados do Brasil desde 1988, o que motivou o uso da vacina cubana antimeningocócica (VA-MENGO-C-BC) em campanhas de vacinação em massa (MORAES et al., 1992). O desenvolvimento de uma

vacina eficaz contra meningococo B continua sendo um desafio para pesquisadores de diversas partes do mundo (POOLMAN, 1995).

A imunidade ao meningococo tem sido historicamente associada ao desenvolvimento de anticorpos capazes de ativar o sistema complemento induzindo lise da bactéria, após a formação do MAC (membrane attack complex), o qual é formado pelas 5 proteínas finais do sistema complemento: C5 a C9 (FIGUEROSA e DENSEN, 1991; GOLDSCHNEIDER et al., 1969a; GOLDSCHNEIDER, 1969b). A quantificação dos anticorpos ativadores do complemento (anticorpos bactericidas) tem sido o principal determinante da imunidade ao meningococo conferida por várias vacinas ou doença (ROSENQVIST et al., 1995; van der VOORT et al., 1996).

A maioria das epidemias são causadas pelos sorogrupos A e C, mas ocorreu um aumento da prevalência pelo grupo B logo após a epidemia causada pelos grupos A e C, como foi evidenciado em epidemias ocorridas em várias partes do mundo. Desde 1980, a meningite meningocócica causadas pelas cepas A e C ocorre principalmente na Europa, nos Estados Unidos, China, Nepal, Mongólia, Nova Zelândia, Cuba, Brasil, Chile, Arábia Saudita e Sul da África. No Brasil, após a ocorrência de epidemia causada por meningococos A e C em 1970-75, o sorogrupo B passou a predominar em São Paulo (SACCHI et al., 1998). Mas um dado interessante foi a inversão da proporção entre os grupos B e C, fato que vem ocorrendo desde o final da década de 90 e atualmente no Brasil há o predomínio do sorogrupo C.

Foi demonstrado por GRIFFIS et al., (1984) que a maioria das crianças convalescente da infecção por *N. meningitidis* B não desenvolviam anticorpos específicos para o polissacarídeo B, mas tinham anticorpos bactericidas contra as cepas infectantes. Esta observação somada ao fato que os indivíduos com sistema imune normal raramente sofrem de infecção recorrente, apesar da existência de *N. meningitidis* de diferentes sorogrupos levou ao reconhecimento que a imunidade contra o meningococo deveria estar associada com o desenvolvimento de anticorpos específicos para antígenos não-capsulares. Diversos estudos demonstraram a presença de anticorpos direcionados às

várias proteínas da membrana externa da bactéria, induzidos pela doença ou pela vacinação (MANDRELL e ZOLLINGER, 1989; POOLMAN et al., 1983).

A imunidade para infecções meningocócicas é adquirida durante a colonização da nasofaringe, onde são induzidos anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA. A IgG pode iniciar uma série de funções efetoras, como interação com componentes do sistema complemento como o C1q. Apresenta também papel importante no desenvolvimento da resposta imune celular como a citotoxicidade dependente de anticorpo. Em contraste com a IgA que não se liga aos componentes do complemento, não ativando a via clássica do complemento, enquanto a IgM é extremamente potente na ativação do sistema complemento. A IgA secretória, que serve como primeira linha de defesa, parece ter propriedades antiinflamatória, enquanto a IgA subepitelial e sérica pode interferir nos polimorfonucleares e estimular potentes respostas celulares (VIDARSON et al., 2001).

A importância dos anticorpos foi mostrada pela alta incidência da doença meningocócica em indivíduos com hipogamaglobulinemia e deficiência de componentes do sistema complemento, especialmente C3, inativador de C3b, C5, C6, C7 e C8 e de componentes finais do complemento (FRANK et al., 1987).

Os neutrófilos e macrófagos têm papel importante na imunidade inata, particularmente na infância quando os anticorpos específicos estão ausentes (ROSS et al., 1987; STEPHENS et al., 1986). As células polimorfonucleares de crianças de 2 anos de idade têm a capacidade reduzida de migrar e de realizar a fagocitose. Este fato pode estar associado com o aumento da incidência da doença meningocócica nesta faixa etária. A apresentação de antígenos por macrófago e células dendríticas de crianças é menos eficiente do que a apresentação por células de indivíduos adultos, pois a atividade funcional destas células não são alcançadas até 1 ano de idade (ROSS et al., 1987).

Há tempos que vem se buscando uma preparação vacinal com grande aceitação e principalmente que seja segura e eficaz contra a *N.meningitidis* do sorogrupo B. Países como o Brasil, Cuba, Canadá, USA, Holanda e Noruega, que tiveram epidemias durante as duas últimas décadas, tem investido muito

em pesquisa para vacina contra a doença meningocócica do sorogrupo B (PELTOLA,1998; POOLMAN,1995; De GASPARI, 2000c).

As crianças recém-nascidas são altamente resistentes a meningite meningocócica, tornando-se extremamente susceptíveis após os seis meses de idade ou seja, há uma imunização passiva pela passagem através da placenta de imunoglobulinas, especialmente do isótipo IgG que permanecem até os seis meses de idade. Goldcheneider et al., 1969 observaram que a imunidade diminui entre 6 meses e 12 meses de idade e mostrou que o nível de anticorpos bactericidas é idade-dependente; isto é, conforme aumenta a idade os níveis de anticorpos diminuem .

A variabilidade antigênica de estruturas não capsulares tem sido um problema no desenvolvimento de vacinas para o meningococo B. Estudos relacionados a anticorpos dirigidos contra antígenos de membrana externa do meningococo B sugerem que a resposta imune é cepa-específica e na infecção sistêmica há indução de anticorpos direcionados para Por A, Por B, proteínas da classe 5, antígeno H8 e LPS. Quanto ao LPS pouco se sabe sobre a capacidade deste em induzir uma resposta protetora. No caso do meningococo B parece relacionar-se com a produção de anticorpos bactericidas. (ROSS et al., 1987; POLLARD e FRASCH, 2001).

As vacinas contendo polissacarídeos têm sido úteis na proteção contra os sorogrupos A e C. Os anticorpos específicos induzidos pelas vacinas polissacarídicas antimeningocócica A e C são detectáveis uma semana após a imunização. Os polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A e C induzem principalmente anticorpos dos isótipos IgG e IgM com atividade bactericida (PELTOLA, 1998).

Os polissacarídeos capsulares são úteis para utilização em uma preparação vacinal por ser um componente comum de um sorogrupo, o que simplificaria a produção de vacinas para o meningococo (POOLARD e LEVIN, 2000; POLLARD e FRASCH, 2001), entretanto, para o sorogrupo B continua sendo um desafio em virtude da fraca imunogenicidade desses antígenos, atribuídas à tolerância imunológica devido a semelhança com o oligômero $\alpha(2\rightarrow8)$ N acetil-neuramínico presente nos glicopeptídeos humanos e no tecido

cerebral. Além disso, o polímero de ácido siálico é despolimerizado rapidamente pela neuraminidase nos tecidos e sua estrutura conformacional do epítipo não é ideal para a ligação com anticorpos específicos (POLLARD e FRASH, 2001).

Recentemente, foi divulgada a seqüência completa do genoma da cepa MC58 (B:15:P1.7,16) de *N meningitidis* do sorogrupo B (TETTELIN et al., 2000). À partir dessa divulgação, os pesquisadores da Chiron Vaccines (Siena, Itália) utilizando programas de computadores, analisaram fragmentos de DNA que poderiam codificar para os possíveis antígenos vacinais. Essa estratégia foi denominada vacinologia reversa, pois se inicia com a análise da seqüência genômica ao invés de se estudar potenciais antígenos extraídos da superfície dos microrganismos (PIZZA et al., 2000).

A partir da análise do genoma foram identificados 350 candidatos a antígenos vacinais, os quais foram clonados e expressos em *Escherichia coli*. Das 350 proteínas obtidas, foram selecionadas 85 proteínas e, destas, somente 7 apresentaram bom potencial como candidatas a vacinas. As 7 proteínas foram selecionadas, pois encontravam-se presentes na superfície das bactérias e foram capazes de induzir anticorpos com atividade bactericida em camundongos. Das proteínas bem estudadas até o presente momento podem ser destacadas: GNA33, GNA2132, GNA1870 e NadA.

1.1 Colonização e invasão da mucosa nasofaríngea pelo meningococo

De acordo com Stephens e MacGee (1981), a colonização meningocócica pode se localizar tanto na superfície externa da mucosa como intracelular ou sub-epitelialmente. STEPHENS et al.,(1986); (RAYNER et al.,1995) afirmam que os danos ao epitélio ciliado da nasofaringe podem ser o primeiro passo na colonização e os possíveis danos físicos causados pelo hábito de fumar (ativo ou passivo) aumentam os riscos de se tornar um portador ou desenvolver a doenças invasiva (FISCHER et al., 1997). O “stress” e infecções virais precedentes, os quais alteram a integridade da superfície mucosa ou influenciam na imunidade local e sistêmica também concorrem para

que estes riscos aumentem (RAZA et al., 1999). Os meningococos atravessam o epitélio da mucosa via vacúolos fagocíticos como resultado da endocitose (McGEE et al., 1983; STEPHENS et al., 1983, READ et al., 1995).

Ayala et al. (1998) verificaram que a degradação de uma glicoproteína presente nas membranas de endossomos e lisossomos, promove a sobrevivência dos meningococos nas células epiteliais, sugerindo que a invasão celular pelo meningococo reduz os níveis dos constituintes lisossomais.

1.2 Adjuvantes para imunização de mucosas

Os únicos adjuvantes até hoje licenciados para o uso clínico são os sais de alumínio, principalmente hidróxidos e fosfatos. Entretanto, a maioria dos adjuvantes, de uso clínico ou não, apresentam como principais limitações à necessidade de administração parenteral e efeitos restritos às respostas imunológicas sistêmicas. Os adjuvantes de mucosas, administrado por via oral ou nasal, por sua vez, promovem respostas sistêmicas e locais (SIMÕES e FERREIRA, 2001).

Dos adjuvantes até hoje testados, dois se destacam pelo efeito sobre o sistema imune de mucosas, a toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae* e a toxina termo-lábil (LT), produzidas por algumas linhagens de *E. coli* enterotoxigênica. CT e LT são enterotoxinas do tipo A-B, ou seja, toxinas que apresentam uma subunidade A, responsável pela atividade tóxica, e uma subunidade B, envolvida com a ligação a receptores específicos em células do hospedeiro. LT e CT apresentam 80% de identidade em suas seqüências de aminoácidos; entretanto, CT leva à ativação de respostas imunológicas que se caracterizam pela produção de IgE, o que pode resultar em choque anafilático em animais re-expostos à toxina. Por outro lado, LT induz respostas imunológicas sem o acúmulo de IgE, o que reduz o risco de efeitos colaterais (SIMÕES e FERREIRA, 2001).

1.3 A toxina colérica como adjuvante para uso em vacinas de mucosas

A estrutura molecular da toxina colérica (TC) é composta por uma subunidade A (TC-A) e uma subunidade B (TC-B). A TC-A é toxigênica e é uma proteína de 28 kDa, podendo ser clivada em A1 e A2, sendo a primeira responsável pela atividade enzimática. A TC-B é a subunidade de ligação com as células do hospedeiro. Por análise cristalográfica a TC está intimamente relacionada com a toxina termolábil de *Escherichia coli* (TL), indicada pela presença de uma alfa-hélice que conecta o peptídeo A1 com a TC-B (ELSON e DERTZBAUGH, 1999).

A TC-B é um homopentâmero de 11,6 kDa que forma uma estrutura anelada com um poro central através do qual a subunidade A2 se projeta. A TC-B se liga ao GM1 presente em todas as células nucleadas, incluindo as células M da superfície intestinal, nas quais a toxina sofre a transcitose para a membrana lateral e induz fortes respostas de IgA-S (ELSON, 1996).

De maneira contrária a maioria dos antígenos protéicos, a TC não induz tolerância pela administração oral e induz memória imunológica, fato que pode ser presumidamente aplicado a imunização de outros sítios de mucosas. A adjuvantividade da TC parece estar relacionada com a sua imunogenicidade (ELSON e DERTZBAUGH, 1999).

A resposta imune para a TC é do tipo T-CD4 dependente e, portanto requer a apresentação do antígeno pelas moléculas do MHC de classe II. Em camundongos, a resposta após a imunização intestinal é predominantemente TH2. Elson (1992) estudou a capacidade adjuvante da TC e sua holotoxina (TC-B), relacionando as influências genéticas e seus efeitos em linhagens de camundongos “inbred” e “outbred” na capacidade imunogênica e adjuvante toxina.

Os efeitos adjuvantes da TC estão associados com a indução de ribosilação de ADP e indução de AMP cíclico e com uma variedade de efeitos nas células linfóides. Estes estudos foram recentemente revistos e

extensivamente detalhados por ELSON e DERTZBAUGH (1999). Tais efeitos são demonstrados no soro pela produção de anticorpos IgG e nas mucosas pela produção de IgA e IgM contra os antígenos administrados ao mesmo tempo. Tanto a subunidade livre (TC-B) ou conjugada pode atuar como adjuvante pela via de imunização nasal, no entanto a TC-B não conjugada (holotoxina) não é tão efetiva como adjuvante oral, porém pode exibir alto nível de sinergia aos antígenos. Em geral, a atividade adjuvante da TC nativa está diretamente relacionada com a toxicidade. Apesar da TC apresentar efeitos de toxicidade quando administrada em doses de 5 a 10 µg em estudos animais, doses menores (100 a 500 ng) inibem os efeitos adjuvantes aos antígenos co-administrados (VERHUEL et al., 1993; GRDIC et al., 1998). Devido à dificuldade em segregar todo o efeito toxigênico, têm-se produzido cepas mutantes com toxicidade reduzida ou ausente, mas significativa atividade adjuvante (WU e RUSSEL, 1993; GUILLOBEL, 2000). A quantidade de TC administrada pela via intranasal é um fator importante para a indução de uma boa resposta imune (ELSON, 1996).

1.4 O LPS como adjuvante para uso em vacinas de mucosas

O LPS estimula os macrófagos a secretarem interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), oxigênio reativo, nitrogênio intermediário (óxido nítrico), interferon α , β e γ , fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas. Mesmo quantidades pequenas de endotoxinas são capazes de induzir a resposta inflamatória. A toxicidade é devida à presença do lipídeo A e a produção de mutantes (sem o lipídeo A) fazem-no mais aceitável para o uso em vacinas, pois a reatogenicidade deixa de existir, a endotoxicidade é reduzida e a atividade adjuvante é retida. Adicionalmente, esta molécula tem chamado atenção principalmente nos estudos de vacinas para *N. meningitidis* B (STEEGHS et al., 1999). A atividade endotoxina do LPS também pode ser reduzida por modificação química ou enzimática do lipídeo A. Verhuel et al., (1993) utilizaram LPS meningocócico como adjuvante em vacinas. A baixa imunogenicidade de complexos de membrana externa (OMC) de um

meningococo mutante, deficiente em LPS pode ser aumentada quando o LPS é adicionado à preparação antigênica, como adjuvante. Algumas formas de lípido A têm sido produzidas e testadas como alternativas não tóxicas como é o caso do MPL (monophosphorylipid A) que possui muitos dos efeitos adjuvantes do LPS (ELSON e DERTZBAUGH, 1999). Esse adjuvante pode ser combinado com outros adjuvantes e tem se mostrado seguro para uso em humanos.

Ao contrário da TC, o LPS pode ser administrado como adjuvante em diferentes tempos em relação ao antígeno (ELSON e DERTZBAUGH, 1999). Adicionalmente, quando o LPS é administrado pela via nasal, perde o seu efeito tóxico (KATIAL e al., 2002).

1.5 As principais propriedades dos adjuvantes

*Diminuição do período necessário para a indução da resposta imune e aumento da duração da resposta de memória imunológica.

*Capacidade de modular a avidéz, a especificidade, o isótipo e/ou a distribuição dos anticorpos gerados.

*Aumento da resposta imunológica em indivíduos idosos ou imaturos imunologicamente.

*Em alguns casos, promover a indução de imunidade em mucosas (adjuvante de mucosa).

Aumento da potência imunológica de peptídeos recombinantes ou sintéticos.

*Capacidade de modular a resposta imune, tanto celular como humoral.

Desde a descrição do sistema imune de mucosas tem havido um considerável progresso no entendimento da imunidade secretória em humanos.

A maioria das proteínas e vacinas peptídicas apresenta atividade imunogênica somente quando administradas em meio aquoso com o auxílio de adjuvantes para a indução da resposta imunológica desejada (ELSON e DERTZBAUGH, 1999).

Adjuvantes são definidos como um grupo de componentes estruturalmente heterogêneos utilizados para se conseguir um aumento da resposta imune para um antígeno (STORNI et al., 2005). Classicamente são reconhecidos alguns exemplos de adjuvantes: emulsões, saponinas, sais de alumínio ou cálcio, polímeros surfactantes não-iônicos, derivados de lipopolissacarídeos (LPS), micobactérias entre outros (OGRA et al., 2001). Teoricamente, cada molécula ou substância capaz de favorecer os eventos imunológicos, promovendo uma melhor resposta imune pode ser definida como um adjuvante (STORNI et al., 2005). Devido à necessidade de otimização da segurança e eficácia dos antígenos utilizados, as pesquisas atuais em imunização de mucosas têm-se focado no estudo de adjuvantes, entre os quais destacam-se as toxinas e seus derivados (BOUVET e FISCHETTI, 1999).

1.6 *Bordetella pertussis*

O gênero *Bordetella* inclui coco-bacilos aeróbicos restritos, gram-negativos de 0,2 a 0,3 µm por 0,5 a 1,0µm, podendo aparecer isolados, em pares ou pequenos grupos. Em culturas primárias têm aspecto uniforme mas em subculturas tornam-se pleomórficas e filamentosas.

Durante a infecção pela *B.pertussis* são liberadas vários fatores de virulência, incluindo adesinas e toxinas, envolvidos tanto na infecção como na doença (KHELEF et al., 1994).

Entre as toxinas envolvidas na doença caracterizam-se a toxina pertussis, (PTX), a hemolisina adenilato-ciclase (HAC), a citotoxina traqueal (TCT), a toxina dermanecrótica (DNT) e a endotoxina lipopolissacaríde (LPS). (CROWCROFT e PEBODY, 2006; MATOO e CHERRY, 2005; PRESTON, 2005).

Entre os fatores envolvidos na infecção encontram-se as adesinas, hemaglutinina filamentosa (FHA), aglutinógenos (Ags) e perractina, uma proteína de 69 kDa associada à membrana e envolvida na adsorção da bactéria à membrana das células (LOCHT, 1999).

1.6.1 *Bordetella pertussis* como adjuvante para uso em vacinas de mucosas

Bactéria gram-negativa, a *B. pertussis* é o agente causador da coqueluche. Sendo que o primeiro organismo foi isolado de um paciente e identificado como a causadora da doença no início do século XIX. Foi desenvolvido uma vacina com a utilização de células íntegras eficaz no controle da doença, e que continua em uso até os dias de hoje. Uma das importantes considerações a respeito da produção de uma nova vacina é a patofisiologia da *Bordetella pertussis*, identificação dos fatores de virulência e a aprovação de seu papel na doença, estes fatores fornecerão bases mais confiáveis para o desenvolvimento da vacina, a qual teve uma base empírica (sem base científica) no passado (WEISS e HEWLETT, 1986).

As cepas virulentas possuem uma cápsula, as bactérias fixam-se especificamente à células ciliadas na traquéia, primeiro impedindo sua ação e então progressivamente destruindo-as. Isto impede o movimento do muco pelo sistema da escada rolante ciliar. A *B. pertussis* produz várias toxinas. A citotoxina traqueal, uma fração da parede celular da bactéria, é responsável pela lesão às células ciliadas, e a toxina *pertussis* está associada aos sintomas sistêmicos da doença. A doença é transmitida por inalação de patógenos expelidos pela tosse das pessoas infectadas. É altamente infecciosa, com uma taxa de transmissão de 90% entre contatos não-imunes (TORTORA e al., 2002).

B. pertussis é um patógeno exclusivamente humano altamente contagioso por meio de gotículas de saliva e aerossóis. Possui diversos fatores de virulência que incluem a toxina *pertussis* (TP), filamentos de hemaglutinina (FHA), hemolisinas, toxina termo-lábil, endotoxina (LPS), entre outros, que determinam a aderência ao epitélio ciliado do trato respiratório e as atividades biológicas que incluem leucocitose, mitogenicidade e efeitos adjuvantes. O LPS de Bp possui as mesmas propriedades do LPS de outros patógenos Gram negativos, que incluem pirogenicidade, toxicidade, indução de imunidade não-específica, produção de citocinas, etc. (FRIEDMAN, 1988; PARTON, 1999). Interações da bactéria com as células epiteliais respiratórias podem modular as

respostas imunes do hospedeiro pela secreção de IL-6 e, em menores níveis IL-8 (BASSINET et al., 2004).

A imunização com “whole cells” (wc) de *B. pertussis* morta pelo calor ou a imunização com vacinas acelulares contendo *B. pertussis* detoxificada confere proteção em humanos e animais (van den BERG et al., 1999). Estudos demonstraram que os filamentos de hemaglutinina, as fímbrias ou a pertactina purificada de *B. pertussis* foram capazes de proteger camundongos contra um desafio com *B. pertussis*. Em humanos, as presenças de anti-FHA e anti-fímbria têm sido correlacionadas com a proteção contra infecção por este patógeno (van den BERG et al., 1999). Particularmente a *B. pertussis* aumenta a resposta celular, mas também pode provocar a elevação da resposta humoral, induzindo a produção de anticorpos dos isótipos IgG e IgE (ELSON e DEUTZBAUGH, 1999).

Haugan et al. (2003) comparando os efeitos adjuvantes de Bp e TC em uma vacina nasal para *Influenza vírus* (INV) em camundongos verificaram efeitos semelhantes entre IgG e IgA produzidos no soro e saliva dos camundongos imunizados, para os dois adjuvantes utilizados.

Berstad et al. (2000) testaram wc de *N. meningitidis* e *B. pertussis* mortas, utilizadas como adjuvantes em uma vacina nasal para INV em camundongos e observaram uma substancial elevação nos títulos de IgG e IgA sérica e IgA na saliva dos animais imunizados. Os autores verificaram ainda, reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos para *N. meningitidis* e *B. pertussis*.

Thompson et al. (1993), estudando anticorpos monoclonais para proteínas reguladas pelo ferro (IRP) de *N. meningitidis* verificaram que essas proteínas se relacionavam com um grupo de citotoxinas encontradas em diversos patógenos gram negativos, entre eles a *B. pertussis*.

O potencial uso em humanos verificado pela existência de vacinas efetivas utilizadas em crianças, a presença de antígenos de reatividade cruzada com o meningococo, a semelhança da via de contágio entre esses dois patógenos e as suas propriedades imunogênicas e adjuvantes

demonstram que a *B. pertussis* é importante para o estudo de adjuvantes em vacinas de mucosas para *N. meningitidis*, em especial para uso em crianças.

1.7 LPS

O LPS está localizado na membrana externa bacteriana, entretanto é liberado também para o meio externo durante a fase logarítmica de crescimento “*in vitro* e “*in vivo*” (VERHUEL et al., 1993).

O LPS é composto de três regiões (1) uma região basal glicolípídica que está ancorado à membrana externa (2) uma região conhecida como core (3) uma região oligossacarídica repetida ligada a N-acetilglucosamina da região oligossacarídica anteriormente descrita .

As atividades tóxicas atribuídas ao LPS e freqüentemente associada a doença meningocócica, são mediadas pelo lipídeo A. Esse componente do LPS consiste de um dímero N-acetilglucosamina fosforilada com seis a sete ácidos graxos, sendo uma estrutura altamente conservada entre as bactérias gram negativas. A região do core consiste de pequenos açúcares que se ligam à posição 6 N-acetilglucosamina fosforilada do lipídeo A (JENNINGS et al., 1987 a).

O LOS, porção oligossacarídica do LPS, contribui na habilidade dos meningococos de resistirem à atividade bactericida mediada pelo complemento e também, pode se ligar a lectinas expressas pelo hospedeiro contribuindo assim para adesão bacteriana (ESTABROOK et al., 1996).

Dois tipos de epítopo podem ser distintos dentro do LPS: (1) epítotos imunotipo-específico e (2) epítotos de reatividade cruzada (VERHUEL et al.,1993). Os imunotipos específicos formam a base da classificação dos imunotipos meningocócicos.

As cepas de *N.meningitidis* possuem uma grande heterogeneidade de estruturas de LPS e foram classificadas em 12 imunotipos (POLLARD e FRASCH, 2001). As diferenças entre as moléculas de LPS expressas por uma cepa ou as diferenças entre os 12 imunotipos, podem ser encontrados na porção oligossacarídica da molécula do LPS. A maioria das cepas de

meningococo pode expressar mais do que um epítipo imunotipo-específico de seu LPS, o que levou a classificação por exemplo de cepas como L3,7,9 ou L1,8 (VERHUEL et al., 1993).

Quanto à utilização do LPS como componente vacinal, o que tem chamado a atenção, principalmente nos estudos de vacinas para *N.meningitidis* B, é a sua função adjuvante atribuída a essa molécula (MELANCON et al., 1983; GRIFFISS et al., 1988; ZOLLINGER et al., 1991; STEEGHS et al., 1999).

A atividade adjuvante e a toxicidade do LPS parecem estar relacionadas ao lipídeo A. A quantidade de ácidos graxos esterificados no lipídeo A, e também o padrão de fosforilação, determinam essas atividades do LPS (GRIFFISS et al., 1988). Quanto à característica adjuvante do LPS devemos considerar ainda as inter cepas e inter espécies que parecem influenciar também no comportamento imunológico e imunoquímico do LPS. Além disso, há a influência das condições de crescimento da bactéria (GRIFFISS et al., 1987).

Moran et al., (1994) observaram que mudanças na expressão de LPS podem afetar a sensibilidade quanto à atividade bactericida de diferentes maneiras.

A importância do LPS na indução de anticorpos bactericidas não está totalmente esclarecida. Dados da literatura demonstraram que a atividade bactericida e também a existência de epítopos que induzem a produção de anticorpos com a capacidade de destruir o meningococo, estão presentes na molécula de LPS. Contudo, faltam estudos sobre a neutralização da endotoxina bem como da capacidade de opsonização (VERHUEL et al., 1993).

Apesar do LPS apresentar características promissoras para o desenvolvimento de uma vacina, seu efeito tóxico continua sendo um grande problema. No estudo de vacinas para o meningococo B diversos métodos estão sendo empregados. Neste sentido, existem preparações vacinais que apresentam quantidades de LPS variáveis (2 a 15%). Apesar desta variação, o grande desafio é a obtenção de uma preparação vacinal livre ou com quantidades inferior a 1% de LPS. Estudos vêm sendo realizados empregando

LPS detoxificado (sem o lipídeo A) ou oligossacarídeos derivados de LPS combinados a proteínas de membrana externa (ZOLLINGER et al., 1991 b) .

A maioria das cepas isolada da nasofaringe não é capsulada e também expressa LOS não sialilado, como L1 e L8 (BROOME, 1986; POOLMAN et al., 1995). Cepas que possuem na estrutura do LOS a molécula de lacto-N-neotetrose podem, através da ação catalizadora da enzima sialiltransferase, utilizar o ácido siálico do hospedeiro para sialilar essa molécula.

Os fenótipos de LOS com baixa sialilação, como L8, predominam na fase inicial da infecção pois favorecem a entrada da bactéria nas células da mucosa entretanto são mais susceptíveis à atividade bactericida (MORAN et al., 1994). Contudo, cepas com LOS altamente sialilados como por exemplo L3, L7 e L9, são incapazes de penetrar nas células epiteliais, mas são mais resistentes à morte mediada por anticorpos e complemento (ESTABROOK et al., 1997).

As cepas de meningococo podem ainda expressar mais que um imunotipo e, sob pressão das defesas do hospedeiro, pode sofrer mudanças genéticas deixando de expressar determinado imunotipo (JENNINGS et al., 1999).

Esses achados podem contribuir no desenvolvimento de uma vacina para *N.meningitidis* B sem os riscos dos efeitos tóxicos ocasionados por essa molécula.

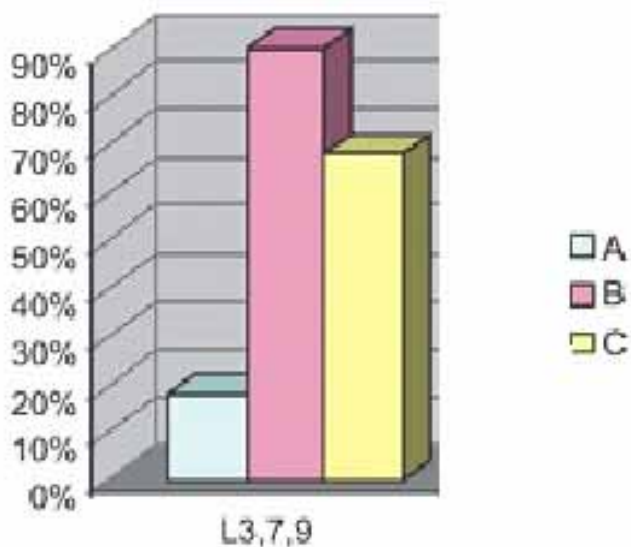


Figura 1- Estudo da reatividade por meio de *Imunodot* dos Anticorpos monoclonais para o imunotipo $L_{3,7,9}$ presente em cepas de *N. meningitidis*, isoladas durante epidemias no Brasil. (A) cepas *N. meningitidis* do sorogrupo A, (B) cepas *N. meningitidis* sorogrupo B, (C) cepas *N. meningitidis* do sorogrupo C. Imunoreatividade com os anticorpo monoclonal AcM 4BE12-C10 ($L_{3,7,9}$)

1.8 Imunidade em neonatos

A sensibilidade de neonatos para as doenças infecciosas se deve parcialmente a falta de memória imunológica prévia e ao pequeno número de células presentes nos tecidos linfóides periféricos no início da vida (Adkins et al., 2004). Além dessas diferenças quantitativas, muitos estudos em humanos e camundongos têm demonstrado que as células imunes de neonatos são qualitativamente distintas das células de adultos e, entre as células de mesmo subtipo existem diferenças fenotípicas. Em adição, muitos estudos “in vivo” e “in vitro” têm descrito deficiências ou diferenças entre as células T, B e células apresentadoras de antígenos (APCs) em neonatos. Até uma década atrás, os neonatos eram considerados imunodeficientes. Este conceito se devia à limitada produção de interleucina-2 (IL-2) e células T. No entanto, segundo Adkins (2000 e 2002), com a descoberta das populações de células TH1/TH2,

tornou-se claro que as respostas T-celulares em camundongos neonatos não eram deficientes, mas tendiam para a resposta TH2. A identificação de subclasses de células T de memória foi, portanto um grande avanço para que novos estudos fossem realizados com o intuito de modulação da resposta imune em neonatos (SALLUSTO et al., 1999, SALLUSTO et al., 2000). Kovarik e Siegrist (1998) estudaram a quantidade de anticorpos maternos presentes no momento da imunização da criança, levando em consideração o tipo e a quantidade do antígeno, a via de imunização e a idade da criança ao receber a vacina sugerindo que, as várias estratégias vacinais utilizadas incluindo a imunização de mucosas parecem ser pouco afetadas pelos anticorpos maternos, demonstrando que neonatos são capazes de produzir anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA quando expostos a antígenos e ainda, que a aquisição de uma resposta completa com diversificação do repertório de anticorpos, semelhante aos adultos ocorre entre dois e seis meses de vida para o isótipo IgM, porém um pouco mais tarde para o isótipo IgG.

Todavia, há mais de trinta anos sabe-se que os neonatos não respondem a certas bactérias capsuladas antes da idade de dois anos, o que cria um intervalo de suscetibilidade a infecções no momento em que desaparecem os anticorpos protetores maternos (GOTSCHLICH et al., 1969).

Devido aos fatores de suscetibilidade e baixa eficácia em crianças menores de 2 anos de idade, a imunização desses indivíduos é um campo particularmente importante, com vários desafios para a pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas.

Pollard et al. (1999) estudaram imunidade em crianças menores de 12 meses contra o meningococo B e verificaram que nesta faixa etária houve um desenvolvimento semelhante dos níveis de IgG em relação os anticorpos desenvolvidos por crianças maiores de 10 anos, sendo os isótipos destes anticorpos em sua maioria IgG1 e IgG3. No entanto, os anticorpos IgG das crianças menores de 12 meses eram de baixa avidéz e sem nenhuma atividade bactericida, enquanto que nas crianças maiores de 10 anos, estes anticorpos eram de alta avidéz correlacionando-se de maneira direta com a atividade bactericida (POLLARD e LEVIN, 2000).

Estas tentativas de se estabelecer as razões da baixa eficácia das crianças contra o meningococo B, sugerem que as crianças menores apresentam diferenças na maturação da afinidade dos anticorpos IgG e que a baixa avidéz destes anticorpos pode estar relacionada com a baixa eficácia nesta faixa etária.

Como a proteção contra o meningococo B é dependente do desenvolvimento de anticorpos bactericidas (POLLARD e LEVIN, 2000; JODAR et al., 2002), várias estratégias têm sido estudadas para que se consiga levar ao desenvolvimento de anticorpos bactericidas e de alta avidéz em crianças imunizadas, entre as quais, a escolha de adjuvantes adequados.

Vacinas baseadas em OMVs, além de serem pouco imunogênicas em crianças menores de 12 meses induzem resposta sorosubtipo, ou seja, os anticorpos gerados conferem apenas proteção contra cepas homólogas (ZOLLINGER, 1997; JODAR et al., 2002). As vacinas cubana e norueguesa mostraram resposta direcionada contra cepas heterólogas, com a produção de anticorpos bactericidas somente em indivíduos maiores de 10 anos de idade e adultos (TAPPERO et al., 1999).

Vários estudos têm demonstrado que a presença da porina A (PorA) em vacinas baseadas em OMV induz ao aumento da atividade bactericida no soro (ZOLLINGER, 1997; TAPPERO, 1999; POLLARD e FRASCH, 2001; JODAR e al., 2002). Segundo Rosenqvist et al. (1995) e Milagres et al. (1998), os anticorpos produzidos em indivíduos adultos vacinados contra o meningococo B foram dirigidos para as proteínas de classe 2 e em menor extensão para as proteínas de classe 5. Quando os indivíduos eram menores de 12 meses os anticorpos foram predominantemente direcionados contra a proteína PorA (TAPPERO et al., 1999).

Por estas características foi desenvolvida na Holanda, uma vacina hexavalente baseada em OMVs de duas cepas, cada uma expressando 3 subtipos (PorA) diferentes, escolhidos dos seis subtipos prevalentes naquele país e em grande parte da Europa. No entanto, 4 doses desta vacina (Hexamen®) não foram suficientes para a indução de anticorpos bactericidas em crianças menores de 12 meses (LONGWORTH et al., 2002). Entre as

cepas circulantes nos EUA, esta vacina confere proteção de apenas contra 50% das cepas associadas à doença meningocócica do sorogrupo B (JODAR et al., 2002). Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de se identificar novos antígenos baseados em proteínas conservadas, capazes de indução à produção de anticorpos de reatividade cruzada entre a diferentes cepas de *N. meningitidis* e que sejam imunogênicas em crianças menores de 2 anos de idade (MARTIN et al., 1997; De GASPARI, 2000; SIEGRIEST, 2001; COMANDUCCI et al., 2002), no entanto, existem poucos estudos utilizando modelo animal para demonstrar a importância da imunização neonatal contra patógenos de natureza bacteriana (RAYEVSKAYA et al., 2002; RODUIT et al., 2002; EISENBERG et al., 2003).

1.9 Avidéz de anticorpos

Durante a reação imune, as respostas celulares primárias produzem anticorpos IgM de baixa afinidade. Com a progressão da resposta imune, a maturação das células B toma lugar, aumentando a sua afinidade pelo antígeno. Ocorre então um “switch” de classe de IgM para IgG, fenômeno que exige a seleção de clones celulares de alta afinidade com maior capacidade reconhecimento de agentes externos (GRANOFF et al., 1998). Em alguns casos a quantidade de anticorpos bactericida se torna limitada, como no caso de crianças menores de 2 anos de idade que recebem vacinas antimeningocócicas polissacarídicas. Além disso, existem dificuldades envolvidas no desenvolvimento dos ensaios para a avaliação da atividade bactericida dos soros, incluindo variação dos resultados dependente da cepa utilizada, condições de crescimento bacteriano e fonte de Complemento. Granoff et al. (1998) desenvolveram um ensaio de ELISA no qual utilizando um componente caotrópico, foram capazes de medir as concentrações de anticorpos anti-capsulares para o meningococo C. Os resultados da atividade funcional dos anticorpos produzidos por indivíduos imunizados, medida no ensaio de avidéz apresentou correlação linear com a atividade bactericida nos soros. Diferentes substâncias caotrópicas podem ser utilizadas em diferentes concentrações e pH, capazes de causar alterações na força iônica das ligações antígeno-anticorpo, determinando a eluição de

ligações fracas, ou seja, de baixa avidéz, enquanto moléculas com alta força de ligação não são eluídas. Devido à característica de maturação das células B, o ensaio de avidéz é muito útil para a diferenciação entre as respostas imunes primárias e secundárias. Testes de avidéz de IgG têm sido utilizados para o diagnóstico de infecções virais, para a discriminação entre infecções primárias e reinfecções ou reativações e ainda, para se estimar a eficácia ou falhas vacinais (NARITA et al., 1998; de SOUZA et al., 2004).

Vermont et al. (2002), utilizando NaSCN 1,5M para a análise do índice de avidéz de anticorpos IgG para anticorpos produzidos por uma vacina OMV de meningococo B verificaram altos títulos de anticorpos funcionais que se correlacionaram fortemente com a atividade bactericida.

Soenawan et al. (2004), estudaram os mecanismos envolvidos na resposta imunológica, após imunizações pela via oral *versus* imunização pela via intramuscular com a toxina colérica em camundongos. Os autores utilizaram o tiocianato de amônia a 4N e observaram uma variação nos índices de avidéz de acordo com a fase da resposta imune. No entanto, após a imunização oral os anticorpos persistentes de maior funcionalidade pertenciam ao isótipo IgM, sugerindo ser este isótipo importante na manutenção da memória imunológica.

Fusakawa et al.(2004), em imunizações de camundongos neonatos com duas formulações de vacina OMV contra os meningococos B e C, verificaram que alguns adjuvantes que atualmente estão em testes em humanos, tais como MPL (Monofosforil Lípide A), "Titermax" e MF59 Monofosforil 59), seriam capazes de indução a produção de anticorpos do isótipo IgG de alta avidéz. Os autores puderam concluir que a utilização do adjuvante MF59 foi capaz de aumentar a resposta induzida por vacinas OMVs contra o meningococo B e os anticorpos apresentaram acentuada funcionalidade quando medidos por meio de ELISA utilizando o tiocianato de potássio 1,5 M como agente caotrópico.

Usinger e Lucas (1999) compararam o índice de avidéz e a atividade de opsonização de anticorpos IgG2 produzidos em soros de camundongos imunizados contra *S. pneumoniae* dos sorotipos 6B e 23F, verificando que houve uma correlação inversa entre a magnitude da resposta e a quantidade

de anticorpos necessários para proteger os camundongos de uma bacteremia letal, causada pelo sorogrupo 6B, demonstrando que anticorpos de maior avidéz foram mais efetivos na destruição do pneumococo quando comparados com os de baixa avidéz.

6 CONCLUSÃO

Vários estudos estão em andamento em nosso laboratório, os dados obtidos provavelmente venham contribuir na formulação de um novo esquema de imunização e preparo de uma vacina contra a bactéria *N.meningitidis* B. Esta bactéria, pela grande diversidade de tipos (cepas) existentes, tem sido o objeto da atenção de vários centros de pesquisa no mundo. O modelo camundongo neonato é uma etapa necessária para liberação e aprovação de novas vacinas antes da aprovação para serem utilizadas no seres humanos principalmente em crianças. Muitos estudos ainda são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADKINS, B.; BU, Y.; CEPERO, E.; PEREZ, R. Exclusive TH2 primary effector function in spleens but mixed TH1/TH2 function in lymph nodes of murine neonates. **J. Immunol.**, v. 164, p. 2347-2353, 2000.

ADKINS, B.; BU, Y.; GUEVARA, P.; Murine neonatal CD4+ lymph node cells are highly deficient in the development of antigen-specific TH1 function in adoptive adult hosts. **J. Immunol.**, v.169, p. 4998-5004, 2002.

AYALA, P.; LIN, L.; HOPPER, S.; FUKUDA, M.; SO, M. Infection of epithelial cells pathogenic neisseriae reduces the levels of multiple lysosomal constituents. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5001-5007, 1998.

BASSINET, L.; FITTING, C.; HOUSSET, B.; CAVAILLON, J. M.; GUIZO, N. Bordetella *pertussis* adenylate cyclase-hemolysin induces Interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5530-5533, 2004.

BERGQUIST, C.; LAGERGARD, T.; HOLMGREN, J. Anti-carrier immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1579-1583, 1997.

BERSTAD, A.K.; ANDERSENA, S.R.; DALSEGA, R.; DRUMTORP, S.; HOLST, J.; NAMORK, E. Inactivated meningococci and pertussis bacteria are immunogenic and act as mucosal adjuvants for a nasal inactivated *influenza* virus vaccine. **Vaccine**, v. 18, p. 1910-1919, 2000.

BOUVET, J. P.; FISCHETTI, V.A. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2687-2691, 1999.

BROOME, C.V. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 18, p. 25-34, 1986. Suppl. A.

CARMO, A.M.S. **Estudo da imunogenicidade da proteína de Classe 5C de *Neisseria meningitidis* em camundongos imunizados pela via nasal.** 2005. 122 f. Dissertação (Mestrado). Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria da Saúde, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2005.

CHACKERIAL, B.; LOWY, 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.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COMANDUCCI, M.; BAMBINI, S.; BRUNELLI, B.; ADU-BOBIE, J.; ARICO, B.; CAPECCHI, B. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, v.195, p. 1445-1454, 2002.

COUTINHO, L.M.C. **Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacáride da cepa epidêmica de B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis*: Imunização intranasal.** 2002. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CROWCROFT, N.S.; PEBODY, R.G. Recent developments in pertussis. **Lancet**, v. 367, p.1926-1936, 2006.

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

DE GASPARI, E.N. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacterial genera. **Hybridoma**, v.19, p. 445-453, 2000.

DE SOUZA, V.A; FERNANDES, S.; ARAUJO, E.S.; TATENO, A.F.; OLIVEIRA, O.M.; OLIVEIRA,R.R. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1782-1784, 2004.

DOUCE. G.; GIULIANI, M.M.; GIANNELLI, V.; PIZZA, M.G.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G. Mucosal immunogenicity of genetically detoxified derivatives of heat labile toxin from *Escherichia coli*. **Vaccine**, v.16, p. 1065-1073, 1998.

DRABICK, J.J.; BRANDT, B.L.; MORAN, E.E.; SAUNDERS, N.B.; SHOEMAKER, D.R.; ZOLLINGER, W.D. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. **Vaccine**, v. 18, p. 160-172, 1999.

EISENBERG, J.C.; CZINN, S.J.; GARHART, C.A; REDLINE, R.W.; BARTHOLOMAE, W.C.; GOTTWEIN, J.M. Protective efficacy of anti-*Helicobacter pylori* immunity following systemic immunization of neonatal mice. **Infect Immun.**, v. 71,p. 1820-1827, 2003.

ELSON, C.O.; DETZBAUGH, M.T. Mucosal adjuvants. In: OGRA, P.L.; MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J.; MCGHEE, J.R. (Ed.). **Mucosal Immunology**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. p. 817-838.

ELSON, C.O. Cholera toxin as a mucosal adjuvant: effects of H-2 major histocompatibility complex and lps genes. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2874-2879, 1992.

ELSON, C.O. Cholera toxin as mucosal adjuvant. In: KIYONE, H.; OGRA, P.L.; McGHEE, J.M. (Ed.). **Mucosal vaccines**. San Diego, California: Academic Press, 1996. p. 59-72.

ESTABROOK, M.M.; CHRISTOPHER, N.C.; GRIFFIS, J.M.; BAKER, C.J.; MANDRELL, R.E. Sialylation and human neutrophil killing of group C *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 166, p.1079-1088, 1992.

FISCHER, M.; HEDBERG, K.; CARDOSI, P.; PLIKAYTIS, B.D.; HOESLY, F.C.; STEINGART, K.R. Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.16, p.979-983, 1997.

FRASCH, C. E.; VAN ALPHEN, L.; HOLST, J.; POOLMAN, J. T.; ROSENQVIST, E. Outer membrane vesicles vaccines for meningococcal disease. **Methods Mol. Med.**, v. 66, p. 81-107, 2001.

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

FRIEDMAN, R.L. The disease and new diagnostic methods. **Clin. Microb. Rev.**, v. 1, p. 365-376, 1988.

FUSAKAWA, L.O; DIAS WO; SCHENKMAN, R.P.F.; RAW I; TANIZAKI, M.M. Adjuvant can improve protection induced by OMV against *Neisseria meningitidis* serogroups B/ C in neonatal mice. **FEMS Immun. Med. Microb.**, v. 41, p. 205-210, 2004.

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. Human Immunity to the meningococcus I – The role of humoral antibodies. **J. Exp. Med.**, v. 129, p. 1307-1326, 1969a.

GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E.C.; ARTENSTEIN, M.S. Human Immunity to the meningococcus II – Development of natural immunity. **J. Exp. Med.**, v. 129, p. 1327-1348, 1969b.

GOTSCHLICH, E.C.; GOLDSCHNEIDER, I.; ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. **J. Exp. Med.**, v.129, p. 1367-138, 1969.

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

GRDIC, D; HORNQUIST, E; KJERRULF, M; LYCKE, N.Y. Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8+ T cells in the normal gut mucosa. **J. Immunol.**, v. 160, p. 754-762, 1998.

GRIFFISS, J. M.; BRANDT, B. L.; BROUD, D. D.; GOROFF, D, K.; BAKER, C. J. Immune response of infants and children to disseminated infections with *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, v. 150, p. 71-79, 1984.

GRIFFISS, J.M. Epidemic meningococcal disease: synthesis of a hypothetical immunoepidemiologic model. **Rev. Infect. Dis.**, v. 4, p. 159-172, 1987.

GRIFFISS, J.M.; SCHNEIDER, H.; MANDRELL, RE.; YAMASAKI, R.; JARVIS, GA.; KIM, J.J. Lipooligosaccharide: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, p. 287-295, 1988.

GRIFFISS, J. M.; YAMASAKI, R.; ESTABROOK, M.; KIM, J. J.; Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. **Trans. R. Soc. Trop. Med.**, v. 85, p. 32-36, 1991.

GUILLOBEL, H.C.; CARINHANHA, J.I.; CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J.D.; DE ALMEIDA, D.F.; FERREIRA, L.C. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine strain. **Infect. Immun.**, v.68, p. 4349-4353, 2000.

HAUGAN, A.; THI DAO, P.X.; GLENDE, N.; BAKKE, H.; HAUGEN, I.L.; JANAKOVA, L. *Bordetella pertussis* can act as adjuvant as well as inhibitor of immune responses to non-replicating nasal vaccines. **Vaccine**, v. 22, p. 7-14, 2003.

HARVILL, E. T.; COTTER, P.A.; MILLER, J.F. Pregenomic comparative analysis between *Bordetella bronchiseptica* RB50 and *Bordetella pertussis* Tohama I in murine models of respiratory tract infection. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 6109-6118, 1999.

JODAR, L.; FEAVERS, I.M.; SALISBURY, D.; GRANOFF, D.M. Development of vaccines against meningococcal disease. **Lancet**, v.359, p.1499-1508, 2002.

KATIAL, R. K.; BRANDT, B. L.; MORAN, E. E.; MARKS, S.; AGNELLO, V.; ZOLLINGER, W. D. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 702-707, 2002.

KHELEF, N.; BACHELET, C.M.; VARGAFTIG, B.B.; GUIZO, N. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. **Infect. Immun.**, v.62, n. 7, p. 2893-900, 1994.

KOVARIK, J.; SIEGRIST, C.A. Immunity in early life. **Immunology Today**, v.19, p. 150-152, 1998.

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

LOCHT, C. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. **Int. Microbiol.**, v.2, p.137-44,1999.

LONGWORTH, E.; BORROW, R.; GOLDBLATT, D.; BALMER, P.; DAWSON, M.; ANDREWS, N. Avidity maturation following vaccination with a meningococcal recombinant hexavalent PorA OMV vaccine in UK infants. **Vaccine**, v.20, p. 2592-2596, 2002.

MARTIN, D.; CADIEUX, N.; HAMEL, J.; BRODEUR, B.R. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1173-1183, 1997.

MANDRELL, R.E.; ZOLLINGER, W.D. Human immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection or vaccination. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1590-1598, 1989.

MATTOO, S.; CHERRY, J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 326-82, 2005.

MILAGRES, L. G.; RAMOS, S. R.; SACHI, C. T.; MELLES, C. E. A.; VIERA, V. S. D.; SATO, H.; BRITO, G. S.; MORAES, J. C.; FRASCH, C. E. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: Comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4419 – 4424, 1994.

NARITA, M.; MATSUZONO, Y.; TAKEKOSHI, Y.; YAMADA, S.; ITAKURA, O.; KUBOTA, M. Analysis of mumps vaccine failure by means of avidity testing for mumps virus-specific immunoglobulin G. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 799-803, 1998.

ODEGAARD, T.J.; KALTASHOV, I.A.; COTTER, R.J.; STEEGHS, L.; VAN DER LEY, P.; KHAN, S. Shortened hydroxyacyl chains on lipid A of *Escherichia coli* cells expressing a foreign UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 19688-19696, 1997.

OGRA, P. L.; FADEN, H.; WELLIVER, R.C. Vaccination strategies for mucosal immune responses. **Clin. Microb.**, v. 14, p. 430-445, 2001.

PARTON, R. Review of the biology of *Bordetella pertussis*. **Biologicals**, v. 27, p. 71-76, 1999.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M.M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, p.1816-1820, 2000.

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.

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

POLLARD, A.J.; GALASSINI, R.; VAN DER VOORT, E.M.; BOOY, R.; LANGFORD, P.; NADEL, S. Humoral immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2441-2451, 1999.

POOLMAN, J.T.; HOPMAN, C.T.; ZANEN, H.C. Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. **Infect. Immun.**, v. 40, p. 398-406, 1983.

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

POOLMAN, J. T.; HOPMAN, C. T. P.; ZANEM, H. C. Problems in the definition of meningococcal serotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 19, p. 339-348, 1982.

POOLMAN, J. T.; WIENTJES, F. B.; HOPMAN, C. T. P.; ZANEN H.C. Influence of the length of lipopolysaccharide molecules on the surface exposure class 1 and 2 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* 2996 (B:2b:p1.2). In: SCHOOHNIK, G.K. The pathogenic neisseriae. **Am. Soc. Microbiol.**, v.23, p. 562-570, 1985.

POOLMAN, J.; BERTHET, F. X. Alternative vaccine strategies to prevent serogroup B meningococcal diseases. **Vaccine**, v. 20, p. 24-26, 2001.

PRESTON, A. *Bordetella pertussis*: the intersection of genomics and pathobiology. **CMAJ**, v.173, n. 1, p. 55-62, 2005.

RAYEVSKAYA, M.; KUSHNIR, N.; FRANKEL, F.R. Safety and immunogenicity in neonatal mice of a hyperattenuated *Listeria* vaccine directed against human immunodeficiency virus. **J. Virol.**, v.76, p. 918-922, 2002.

RAYNER, C.F.; DEWAR, A.; MOXON, E.R.; VIRJI, M.; WILSON, R. The effect of variations in the expression of pili on the interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal epithelium. **J. Infect. Dis.**, v.171, p. 113-121, 1995.

RAZA, M.W.; EL AHMER, O.R.; OGILVIE, M.M.; BLACKWELL, C.C.; SAADI, A.T.; ELTON, R.A. Infection with respiratory syncytial virus enhances expression of native receptors for non-pilate *Neisseria meningitidis* on HEp-2 cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.23, p. 115-124, 1999.

READ, R.C.; FOX, A.J.; MILLER, K.; GRAY, T.; JONES, N.; BORROWS, R. Experimental infection of human nasal mucosal explants with *Neisseria meningitidis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, p. 353-36, 1995.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E. A.; WEDEGE, E.; CAUGANT, D. A.; FROHOLM, L. O. A new variant of serosubtype P1.16 in *Neisseria meningitidis* from Norway, associated with increased resistance to bactericidal antibodies induced by a serogroup B outer membrane protein vaccine. **Microb. Pathog.**, v. 15, p.197-205, 1993a.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E. A.; WEDEGE, E.; KUSECEK, B.; ACHTMAN, M. The 5C protein of *Neisseria meningitidis* is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 1065–1073, 1993.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E.A.; WEDEGE, E.; BRYN, K.; KOLBERG, J.; KLEM, A. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4642-4652, 1995.

ROSS, S.C.; ROSENTHAL, P.J.; BERBERICH, H.N.; DENSEN, P. Killing of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils: implications for normal and complement-deficient individuals. **J. infect. Dis.**, v.155, p. 1266-1275, 1987.

SACCHI, C. T.; DE LEMOS, A. P.; CAMARGO, M. C.; WHITNEY, A. M.; MELLES, C. E.; SOLARI, C. A.; FRASCH, C. E.; MAYER, L. W. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype in São Paulo, Brazil, 1990 to 1996. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 40, p. 65-70, 1998.

SALLUSTO, F.; LANGENKAMP, A.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 251, p. 167-171, 2000.

SALLUSTO, F.; LENIG, D.; FORSTER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, p. 708-712, 1999.

SIEGRIST, C.A. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine**, v.19, p. 3331-3346. 2001.

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v.56, p. 622-64, 1992.

SOENAWAN, E.; SRIVASTAVA, I.; GUPTA, S.; KAN, E.; JANANI, R.; KAZZAZ, J. Maintenance of long-term immunological memory by low avidity IgM-secreting cells in bone marrow after mucosal immunizations with cholera toxin adjuvant. **Vaccine**, v. 22, p. 1553-1563, 2004.

STEEGHS, L.; KUIPERS, B.; HAMSTRA, H.J.; KERSTEN, G.,;VAN ALPHEN, L.; VAN DER LEY, P. Immunogenicity of outer membrane proteins in a

lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4988-4993, 1999.

STEPHENS, D.S.; MCGEE, Z.A. Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. **J. Infect. Dis.**, v.143, p. 525-532, 1981.

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

STEPHENS, D.S.; HOFFMAN, L.H.; MCGEE, Z.A. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 48, p. 369-376, 1983.

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 *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 51, p. 579-585, 1986.

STEPHENS, D.S.; WHITNEY, A.M.; ROTHBARD, J.; SCHOOLNI, K. Pili of *Neisseria meningitidis*. Analysis of structure and investigation of structural and antigenic relationships to gonococcal pili. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 1539-1553, 1985.

STORNI, T.; KUNDIG, T.M.; SENTI, G.; JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.57, p. 333-355, 2005.

TAPPERO, J. W.; LAGOS, R.; BALLESTEROS, A. M.; PLIKAYTIS B.; WILLIAMS D.; DYKES, J. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. **JAMA**, v. 281, p. 1520-1527, 1999.

TETTELIN, H.; SAUNDERS, N.J.; HEIDELBERG, J.; JEFFRIES, A.C.; NELSON, K.E.; EISEN, J.A. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, v.287, p. 1809-1815, 2000.

THOMPSON, S.A.; WANG, L.L.; WEST, A.; SPARLING, P.F. *Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 811-818, 1993.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE. C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Ed. ARTMED, 2002.

USINGER, W. R.; LUCAS, A. H. Avidity as a determinant of the protective efficacy of human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2366-2370, 1999.

VAN DEN BERG, B.M.; BEEKHUIZEN, H.; WILLEMS, R.J.L.; MOOI, F.R.; VAN FURTH, R. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. **Infect. Immun.**, v. 67, p.1056-1062, 1999.

VAN DEUREN, M.; BRANDTZAEG, P.; VAN DER MEER, J.W.M. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. **Clin. Microb. Rev.**, v.13, p. 144-166, 2000.

VERHEUL, A.F.M.; SNIPPE, H.; POOLMAN, J.T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 34-49, 1993.

VERMONT, C.L.; VAN DIJKEN, H.H.; VAN LIMPT, C.J.; DE GROOT, R.; 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. **Infect. Immun.**, v.70, p. 584-590, 2002.

VIDARSON, G.; POL, W. L.; VAN DER ELSEN, J. M. H.; VILE, H.; JANSEN, M.; RUJIS, J.; MORTON, H. C.; BOEL, E.; DAHA, M. R; CORTHESEY, B.; DER WINKEL, J. G. L. Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J. Immunol.**, v. 166, p. 6251-6252, 2001.

WU, H.Y.; RUSSELL, M.W. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 314-322, 1993.

YAZDANKHAH, S.P.; CAUGANT, D.A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 821-832, 2004.

ZOLLINGER, W. D.; MORAN, E. E.; DEVI, S. J.; FRASCH, C. E. Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide–protein conjugate vaccines. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1053–1060, 1997.

ZOLLINGER, W.D.; MANDRELL, R. E.; GRIFFISS, J. M.; ALTIERI, P.; BERMAN, S. Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man. **J. Clin. Invest.**, v. 63, p. 836-848, 1979.

ZOLLINGER, W.D.; BOSLEGO, J.; MORAN, E.; GARCIA, J.; CRUZ, C.; RUIZ, S. Meningococcal serogroup B vaccine protection trial and follow-up studies in Chile. **NIPH Ann.**, v. 14, p. 211-212, 1991.