MARIANA LOPES TEIXEIRA RAPHAEL

**Estudo da imunogenicidade da proteína de classe 3 (PorB)
purificada da membrana externa de *Neisseria meningitidis* :
imunização intranasal/intramuscular em camundongos adultos
e neonatos utilizando *Bordetella pertussis* como adjuvante**

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. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

**São Paulo
2008**

RESUMO

RAPHAEL, M. L. T. **Estudo da imunogenicidade da proteína de classe 3 (PorB) purificada da membrana externa de *Neisseria meningitidis*: imunização intranasal/intramuscular em camundongos adultos e neonatos utilizando *Bordetella pertussis* como adjuvante.** 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Na pesquisa há um forte interesse no desenvolvimento de uma vacina baseada em proteínas da membrana externa (OMPs) de *Neisseria meningitidis*, que são caracterizadas em cinco classes predominantes. Incluído nestas classes estão as proteínas de classe 3 (PorB) que foram identificadas como candidatas na preparação de uma vacina contra a doença meningocócica. No entanto, as vacinas baseadas em OMPs são antígenos que necessitam do uso de adjuvantes para o aumento da imunogenicidade das proteínas de membrana externa, incluindo a proteína de classe 3. Esta vacina é necessária principalmente para crianças, onde nenhuma vacina eficaz existe e dê uma resposta imune de longa duração, especialmente em crianças com dois anos de idade. O objetivo deste estudo é determinar a imunogenicidade da proteína de classe 3, purificada em coluna de Sepharose - 4B (anticorpo monoclonal anti classe 3 de 44/76) da cepa de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B juntamente com a capacidade adjuvante de “whole cells” (wc) de *Bordetella pertussis* (Bp) como adjuvante, frente a uma imunização intranasal, seguida de um “booster” pela via parenteral, conferindo imunidade local e obtenção de células de memória.

Foram imunizados, primeiramente, camundongos BALB/c neonatos em um intervalo de 3 a 12 dias entre 1 e 4 doses da proteína de classe 3 mais adjuvante em estudo, pela via intranasal e no 21º dia pela via muscular com a proteína de classe 3 emulsificada com hidróxido de alumínio, verificando a presença de anticorpos específicos. Os resultados demonstraram que após 2 doses pela via intranasal e 1 dose pela via intramuscular houve rápido estímulo das células imunes nos camundongos adultos e neonatos.

Nós também analisamos a resposta imune em 5 camundongos neonatos *outbred*. Todos os soros foram analisados por ELISA e *immunoblot*. O adjuvante *B. pertussis* administrado pelas vias intranasal ou intramuscular, aumentou a resposta imune comparada com os controles. Nós também observamos que nos grupos de camundongos BALB/c e camundongos *outbred*, imunizados pela via intranasal e intramuscular, com a proteína de classe 3 juntamente com o adjuvante *B. pertussis* 2 doses foram consideradas suficiente para uma sensibilização e rápido estímulo das células do sistema imune. Alta afinidade e anticorpos bactericidas foram produzidos. Os resultados sugerem que *B. pertussis*, um patógeno humano utilizado como adjuvante em vacinas de mucosa, podem preparar o sistema imune, iniciando um aumento na resposta imune humoral e com produção de anticorpos para uma futura imunização em crianças.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*, Proteína de membrana externa, Adjuvantes, Imunização intranasal, Resposta imune humoral, camundongos neonatos e adultos.

ABSTRACT

RAPHAEL, M. L. T. **Study of the immunogenicity of the class 3 proteins (PorB) purified from the outer membrane of *Neisseria meningitidis*: intranasal and intramuscular immunization in adult and neonate mice using *Bordetella pertussis* as adjuvant.** 73 f. [Masters thesis] – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

There is renewed research interest in the development of a vaccine based on proteins of the outer membrane (OMPs) of *Neisseria meningitidis*, which are characterized in five predominant classes. Included in these classes are the proteins of class 3 (PorB) which have been identified as candidates in the preparation of vaccine against meningococcal illness. However, the vaccines based on OMPs are antigens that need the use of an adjuvant to enhance the immunogenicity of proteins of the outer membrane including the class 3 proteins. Such a vaccine is needed mainly in infants where no effective vaccine exists and where it gives an immune response of long duration especially in infants under two years of age. The aim of this study was to determine the immunogenicity of class 3 proteins purified with Sepharose-4B and the monoclonal anti class 3 of 44/76 strain of *Neisseria meningitidis* of the serogroup B along with whole cells (wc) of *Bordetella pertussis* (Bp) as adjuvant, in a model using intranasal immunization, followed by a booster via the intramuscular route, aimed at inducing the production of memory cells.

BALB/c and outbred neonate mice between 3 and 12 days old were immunized with 1 to 4 doses of the purified class 3 proteins with or without adjuvant given by the intranasal route, and on the 21st day the animals received an intramuscular dose of the class 3 proteins with or without aluminum hydroxide. The results demonstrated that after 2 doses by the intranasal route and 1 dose intramuscular there was a rapid stimulation of the immune cells in adult mice as well as neonates. We also analyzed the immune response in 5 outbred neonate mice. All sera were analyzed by ELISA and immunoblot.

The adjuvant *B. pertussis* used in the present investigation and given via the intranasal or intramuscular route increased the immune response compared with the controls.

We also observed that in the groups of BALB/c and outbred mice immunized with class 3 proteins along with the adjuvant *B. pertussis* administered by the intranasal and intramuscular, 2 doses were considered sufficient for a sensitization and quick stimulation of the cells of the immune system. High affinity and bactericidal antibodies were produced.

The results taken together suggest that *B. pertussis*, a human pathogen used as adjuvant for vaccines via the mucosal route, can prime the immune system, prompting an increase in the humoral immune response with the production of antibodies for a future immunization schedule in infants.

Key words: *Neisseria meningitides*, Outer membrane protein, Adjuvants, Nasal immunization, Humoral immune response, Neonates and adults mice.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neisseria meningitidis*

1.1.1 O microrganismo, classificação e tipos antigênicos

A doença meningocócica é conhecida desde 1805, quando Vieussex descreveu uma epidemia de febre cerebrospinal em Genebra. Somente em 1887 é que foi estabelecido por Weichselbaum que a *N. meningitidis* era o agente etiológico dessa infecção. Esta bactéria tem como seu habitat natural a nasofaringe humana, de onde pode penetrar no organismo e disseminar-se, resultando nas mais variadas manifestações clínicas da doença ou permanecer durante dias ou meses nesse sítio, levando o hospedeiro a um estado de portador (MAZZA et al., 1991).

Os meningococos revelam a maior diversidade genética entre os patógenos humanos. Isto é explicado, em parte, pela recombinação horizontal intraespécies (CAUGANT et al., 1998). Tradicionalmente, as cepas foram caracterizadas pelo uso de anticorpos que reconhecem epítomos expostos na superfície da cápsula ou na membrana externa. Por essa técnica, são definidos 12 sorogrupos: A, B, C, H, I, K, L, W135, X, Y, Z e (29E) - identificados por antígenos capsulares, mais de 20 sorotipos - identificados por antígenos de membrana externa de classe 2 ou classe 3 (PorB 37-42 kDa) e imunotipos - identificados por antígenos de membrana externa de classe 1 (PorA 44-47 kDa) (CAUGANT et al., 1998). As proteínas de classe 1, 2 ou 3 funcionam como poros com seletividade para cátions e ânions, respectivamente.

FIGURA 1. *Neisseria meningitidis* – diplococo
FONTE: DE GASPARI, 1998

A PorA e PorB são proteínas da membrana externa do gênero *Neisseria* (WRIGHT, C et al., 2002). A PorB é uma proteína presente na membrana externa na forma de trímeros que atua como ânion-seletivo.

Similarmente à outros organismos gram-negativos o meningococo apresenta a habilidade de expressar no mínimo duas porinas polipeptídicas que correspondem produtos para PorA e PorB (CONCEIÇÃO A. et al., 1998).

A pouca imunogenicidade e a reatividade cruzada da polissacáride capsular B nos tecidos humanos fizeram com que estudos, como o de GEORGINA T. et al., 2006, surgissem para avaliar as proteínas de membrana externa como antígenos e candidatas vacinais para a prevenção da doença contra o meningococo de sorogrupo B.

Segundo o estudo de WRIGHT, C. et al., 2002, as proteínas porinas de meningococos do sorogrupo B, estão identificadas como idatas na inclusão de uma preparação vacinal que previna a doença meningocócica. Este estudo investigou o potencial de uma vacina com a proteína Por B, extraída de *N. meningitidis*, que expressa a proteína porina de membrana externa de classe 3 (PorB3) clonada num vetor pRSETB. Os resultados demonstraram que esta proteína PorB3 é um componente vacinal considerável na prevenção da doença meningocócica do sorogrupo B, que induzem a produção de anticorpos durante a doença, e que estão correlacionadas com o desenvolvimento bactericida. As proteínas de classe 2 (40-42 kDa) e de classe 3 (37-39 kDa) são mutuamente exclusivas.

A PorB apresenta estrutura semelhante a PorA, com oito alças hidrofílicas expostas na superfície das bactérias. Além de apresentar estrutura semelhante à PorA, induz forte resposta imune e é imunogênica (GEORGINA T. et al., 2006), além de apresentarem também uma considerável variação de seqüências, demonstrando favorecer uma vacina com 50 a 80% de proteção eficaz em crianças, jovens e adultos (HEYDERMAN R. S. et al., 2006).

A Por B apresenta quatro regiões com alto grau de variabilidade na sequência de aminoácidos, VR1,VR2,VR3 e VR4, localizadas nas alças 1,5,6 e 7, respectivamente. Estas regiões hipervariáveis compreendem a base para a classificação dos meningococos em sorotipos (POLLARD; FRASCH, 2001). Um exemplo desta tipagem sorológica é a representação da cepa B:4:P1.15, indicando sorogrupo B, sorotipo 4 e subtipo P1.15. Pelo uso das propriedades antigênicas do LPS, outros 13 imunotipos podem ser designados pela letra L (POLLARD; FRASCH, 2001).

A sorotipagem é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de vacinação (CAUGANT et al., 1998).

Segundo HILDE-KARI G. et al, 1993, as proteínas de classe 2 e classe 3 são proteínas predominantes de membrana externa (MARGARET C. B., et al., 1995), determinam sorotipos específicos e são importantes imunodeterminantes em humanos após infecção.

FIGURA 2. Estrutura da membrana externa do meningococo
FONTE: DE GASPARI, 1998

Como técnicas moleculares usadas com este fim, podem ser citadas o DNA *fingerprinting* e o PCR (WOODS et al., 1994). As proteínas de classe 5 ou Opa (*Opacity associated proteins*) apresentam grande variação antigênica, podendo ou não estarem presentes na membrana externa.

Uma bactéria pode apresentar de 1 a 4 proteínas de classe 5, podendo-se observar diferenças antigênicas entre os isolados de diferentes espécimes de um mesmo indivíduo (ACHTMAN et al., 1991).

A proteína Opc, inicialmente denominada 5C, embora apresente algumas propriedades comuns às proteínas de classe 5, distingue-se destas pela sequência de nucleotídeos e pelo mecanismo de controle da expressão (MERKER et al., 1997).

A Rmp proteína de classe 4 (33-34 kDa) com função ainda desconhecida é estruturalmente conservada e encontra-se presente em todas as cepas meningocócicas. Induz anticorpos conhecidos como bloqueadores direcionados para outras proteínas presentes na membrana externa (POLLARD; FRASCH, 2001).

O LOS é formado por uma molécula de lipídio A e uma cadeia de polissacarídeo, que difere do lipopolissacarídeo das enterobactérias que é constituída de um número pequeno de unidades repetitivas (VERHEUL et al., 1993).

A unidade polissacarídica é constituída de moléculas de KDO (ácido 2-ceto-3- desoxi-mano-octonato), heptoses, e a cadeia de oligossacarídeo que apresenta grande variabilidade em extensão e composição podendo expressar diferentes imunotipos (VERHEUL et al., 1993). Atualmente reconhecem-se 11 imunotipos, sendo que, L1 a L8 são associados com os sorogrupos B e C e L10-L11 com o sorogrupo A (SCHOLTEN et al., 1994). Tanto *in vitro* como *in vivo* o LOS destas bactérias está sujeito a várias modificações as quais são controladas por fatores genéticos ou ambientais. A viabilidade da glicose e do ácido siálico, são considerados os principais determinantes ambientais destas variações. *N.meningitidis* B e C produzem ácido siálico e 2,3-sialiltransferase, podendo incorporar ácido siálico ao LOS endogenamente.

A principal estrutura do LOS, que tem a função aceptora de ácido siálico, é a molécula Lacto-N-neotetarose (LNnt). Porém bactérias do imunotipo L8 não são sializadas por não terem dois açúcares finais da molécula de LNnt (VAN-PUTTEN; ROBERTSON, 1995).

Um dos possíveis mecanismos do LPS é que este seria um potente ativador policlonal de células B, atuando como antígeno T-independente (MC GHEE et al., 1999)

A atividade adjuvante e a toxicidade do LPS parecem estar relacionadas ao lipídio A.

A quantidade de ácidos graxos esterificados no lipídeo A e também o padrão de fosforização, é que determinam estas atividades do LPS (GRIFFIS et al., 1987). Na característica adjuvante do LPS devem-se considerar as diferenças intercepas e interespecies que parecem influenciar também no comportamento imunológico e imunoquímico do LPS. Além disso, temos a influência das condições de crescimento da bactéria (GRIFFIS et al., 1987).

1.1.2 Patogenicidade e Manifestações clínicas da infecção por *N. Meningitidis*

As manifestações clínicas da doença meningocócica são e podem se apresentar desde um estado de portador assintomático ou como uma meningococcemia fulminante que geralmente leva à morte em 12 a 48 horas. Entretanto, a maior parte das doenças sistêmicas manifesta-se na forma de meningites ou meningococcemia subaguda ou ambas (MAZZA et al., 1991 ZOLLINGER, 1997).

A meningite meningocócica resulta da disseminação sanguínea da bactéria a partir da nasofaringe e caracteriza-se clinicamente por febre alta, cefaléia, vômitos, rigidez na nuca, alterações de reflexo e, em casos mais graves, convulsões (MAZZA et al., 1991).

A meningococcemia subaguda geralmente tem início abrupto, com febre alta, acompanhada de calafrios, mialgias, cefaléias, alterações de reflexos, náuseas, vômitos e lesões petequiais e equimóticas ou purpúricas (MAZZA et al., 1991).

Anteriormente na era dos antibióticos, a taxa de mortalidade da doença meningocócica era de 65-80%. Atualmente, as taxas de mortalidade estão em torno de 5 a 10% em países industrializados, sendo maiores em países em desenvolvimento (JÓDAR et al., 2002; MORLEY; POLLARD, 2002; ZOLLINGER, 1997).

No Brasil, nos últimos 10 anos, o Estado de São Paulo apresentou uma taxa de letalidade da doença de 18,8% (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, ESTADO DE SÃO PAULO).

Entre os sobreviventes, cerca de 10 a 20% desenvolvem s neurológicas permanentes, tais como epilepsia, retardo mental e surdez (JÓDAR et al., 2002; MORLEY; POLLARD, 2002).

Foi constatado que a incidência da doença era maior em indivíduos que apresentaram baixos níveis de anticorpos com atividade bactericida dependente de complemento. Adicionalmente verificou-se que indivíduos portadores de deficiência nos componentes terminais do sistema complemento apresentaram infecções repetitivas por *N. meningitidis*, confirmando a importância da atividade bactericida dos anticorpos produzidos e complemento na defesa do hospedeiro (POLLARD; FRASCH, 2001).

1.1.3 Faixa etária de maior risco

O pico da incidência da doença meningocócica em níveis endêmicos ocorre em crianças de seis meses a um ano de idade, que correspondem à faixa etária onde os níveis de anticorpos séricos herdados da mãe encontram-se baixos. Entretanto, durante epidemias a idade média dos casos aumenta para 5 a 10 anos de idade (MORLEY; POLLARD, 2002; POLLARD; FRASCH, 2001).

Segundo GEORGINA T. et al., 2006 existem dois grupos de riscos em relação a doença meningocócica, o primeiro grupo refere-se as crianças de 6 a 24 meses e o segundo grupo refere-se a jovens adultos de 15 a 19 anos de idade.

1.1.4 Membrana externa de *N. meningitidis*

A membrana externa contém inúmeras proteínas que permitem a interação dos meningococos às células do hospedeiro ou que atuam como proteínas transportadoras controlando o meio intracelular. Estas proteínas de membrana externa, juntamente com o polissacarídeo capsular, compreendem os principais antígenos de superfície do microorganismo e muitos estudos que utilizam vacinas contendo estes antígenos vêm sendo estudados desde 1987. A membrana externa contém lipopolissacarídeos (LPS) e s (MORLEY; POLLARD, 2002).

De acordo com KLEIJN et al., 2001, a cápsula polissacarídea de sorogrupo B são pouco imunogênicas e apresentam uma estrutura homóloga comparado as do tecido neural embriológico de humanos.

Em decorrência desses fatos, durante anos, as vacinas ingocócicas vêm sendo estudadas pelos vários centros de pesquisa do mundo para se obter uma vacina segura e de longa duração. Para alcançar esta vacina muitos antígenos da membrana externa bacteriana tornaram-se alvos de estudos (MORLEY; POLLARD, 2002; POLLARD; FRASCH, 2001).

Um dos componentes estudados são as vesículas de membrana externa (OMVs), KLEIJN et al., 2001 que são consideradas uma alternativa para uma vacina contra o meningococo B e também a seleção lipopoligossacárides (LPS) que são importantes componentes da estrutura da membrana externa bacteriana (COUTINHO, 2002; BELO, 2002) ou ainda a utilização de anticorpos monoclonais na caracterização de novos antígenos vacinais (BELO, 2004; DE GASPARI, 2000).

A vacina com vesículas de membrana externa contra o meningococo de sorogrupo B aplicada em Cuba e em algumas cidades latinas am s permitiram uma grande eficácia contra a cepa causadora da doença meningocócica naquelas regiões, porém, não sendo efetiva em crianças menores de dois anos de idade (MORLEY et al., 2001). Foram realizados vários testes em Cuba, Brasil, Noruega e Chile, com várias taxas de eficácia dependendo, principalmente, da idade (DE GASPARI et al., 2001).

Da mesma maneira foi realizado um programa de imunização contra a doença causada pelo meningococo B na Nova Zelândia, obtendo também bons resultados, que variaram muito de acordo com a faixa etária. (THOMAS M. G., 2004).

Segundo HEYDERMAN R. S. et al., 2006, as vacinas com vesículas de membrana externa contra o meningococo de sorogrupo B são candidatas à indução de proteção em adultos, porém não prevê nenhuma proteção de longa duração para crianças. A proteção contra a doença depende da habilidade do hospedeiro em induzir a produção de células de memória.

Os níveis de anticorpos produzidos para a proteína de classe 3 (PorB) aumentam gradativamente durante a infância considerando-se aos 10 anos de idade uma quantidade de anticorpos igual ao de um adulto (POLLARD; FRASCH., 2001).

Estes anticorpos são dos isótipos IgG1 e IgG3, que são capazes de induzir proteção em crianças com idade inferior a dois anos, porém os mesmos anticorpos são dirigidos contra antígenos de sorotipo específico (WRIGHT et al., 2002; BOSLEGO et al., 1995; CHRISTODOULIDES et al., 1998; LEHMANN et al., 1999).

1.1.5 Vias de mucosa

Comparadas com as vias sistêmicas padrão, as vias de mucosas possuem várias vantagens que incluem: fácil administração, não invasivas e com menor risco de contaminação, diminuindo os riscos de infecções (OLIVEIRA L. S. O. et al, 2007).

Diferentes adjuvantes têm sido estudados com o intuito de aumentar a imunogenicidade dos antígenos apresentados às vias de mucosas (MC GHEE et al., 1999).

A rede operacional das superfícies externas das mucosas consiste do Tecido Linfóide associado aos intestinos [*gut-associated lymphoid tissue* (GALT)], as estruturas associadas com o broncoepitélio trato respiratório baixo (BALT), tecido ocular, as vias aéreas superiores das glândulas salivárias, tonsilas e nasofaringe (NALT), laringe (LALT), cavidade do ouvido médio, tratos

genitais, glândulas mamárias e os produtos de lactação. Os culos organizados no GALT e BALT são considerados os principais indutores de resposta imune de mucosas (STAATS et al., 1994).

Segundo CHEROUTRE H., 2004, por evolução dos vertebrados, o sistema imune de mucosa fornece uma proteção rápida e eficiente contra inúmeros patógenos e, simultaneamente, mantém a integridade da barreira do epitélio, tolerando microrganismos e permitindo absorção de nutrientes.

Estudos de imunização nasal em camundongos com a proteína A de pneumococos ou com um polissacáride capsular conjugado ao toxóide tetânico demonstrou indução efetiva de resposta de mucosas bem como sistêmica (WU et al., 1999).

A imunização nasal tem sido utilizada com sucesso com sucesso contra *Streptococcus pneumoniae* e os vírus Influenza A e B em crianças e adultos (BELSHE et al., 1998 ; KUNO-SAKAI et al., 1994).

Segundo JOHANSSON et al, 2004, a vacina administrada pela via nasal vem surgindo como a rota mais promissora para indução, não somente de resposta de mucosa, mas também sistêmica. Inclusive neste estudo verificou-se que a vacinação pela via nasal em humanos induziu resposta de anticorpos específicos não somente localizado na mucosa nasal, mas também em mucosa gástrica.

Hoje, observamos na literatura que grupos de pesquisa como os dos Estados Unidos e Noruega, que há mais de 20 anos trabalham com vacinas para o meningococo do sorogrupo B administradas pela via parenteral, também estão investigando alternativas através da imunização nasal, pois até o momento não há uma vacina efetiva para *N. meningitidis* do sorogrupo B (HANEBERG et al., 1998; BAKKE et al., 2001; KATIAL et al., 2002). No Brasil COUTINHO, 2002, COUTINHO, et al., 2004, FERRAZ, 2005, CARMO, 2005 e TUNES, 2006, pesquisam novos antígenos com capacidade de induzir proteção pela via de imunização nasal.

Saunders, et al., 1999, observaram que vesículas de membrana externa nativa (NOMV) induzem altos títulos de anticorpos bactericidas no soro e também uma resposta local nos pulmões quando administradas pela via intranasal. Neste trabalho, os autores observaram que imunização intranasal parece ter impedido a toxicidade causada pelo LPS, diferentemente de quando a mesma preparação antigênica foi administrada pela via intraperitoneal em modelo murino. Vesículas de membrana externa (OMV) administradas pela via intranasal possuem estruturas necessárias para indução tanto de resposta imune de mucosa como sistêmica e para desenvolvimento de memória imunológica.

Haneberg, et al., 1998, administrando uma vacina consistindo de OMV's de *N. meningitidis* B (B:15:P1.7) em voluntários humanos, verificaram que houve desenvolvimento de uma resposta de anticorpos do isótipo IgA nas secreções nasais e na saliva que persistiram por um período de 5 meses. Eles verificaram que a via de imunização nasal inicia uma resposta sistêmica capaz de induzir anticorpos bactericidas. Entretanto, em menores títulos que quando administrada pela via intramuscular. O papel desses anticorpos induzidos pela imunização intranasal necessita de mais estudos. Esses dados mostram que, além de oferecer proteção, a via de mucosas tem sido também uma alternativa para impedir o efeito tóxico do LPS.

Em estudo em nosso laboratório COUTINHO 2002, utilizando preparações antigênicas (native outer membrane complex - NOMC), com maior ou menor expressão de LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8 administradas pela via intranasal, foram analisadas. Essas preparações induziram anticorpos dos isótipos IgG e IgA em camundongos adultos .

Neste estudo, os anticorpos IgG produzidos pela imunização intranasal apresentaram capacidade bactericida, isto é, capazes de destruir o meningococo "in vitro", o que vem ressaltar a importância da resposta imune de mucosas, na determinação do imunotipo do meningococo e na produção de uma vacina contra o meningococo do sorogrupo B (ADKINS et al., 2004).

Devido a diferenças quantitativas, muitos estudos em humanos e camundongos têm demonstrado que as células imunes 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 um década atrás, os neonatos eram considerados imunodeficientes. Este conceito se devia à limitada produção de interleucina-2 (IL-2) e células T. No entanto, com a descoberta das populações de células TH1/TH2 (ADKINS, 2000), tornou-se claro que as respostas T-celulares em camundongos neonatos não eram deficientes, mas tendiam a resposta do tipo TH2 (ADKINS; GUEVARA, 2002). Em camundongos neonatos há uma sobreposição na geração de células T pelos precursores hematopoiéticos. Conseqüentemente, as células T periféricas nas primeiras semanas de vida são uma mistura de células T derivadas de células adultas e fetais (SIEGRIST, et al., 1998).

Estudos sobre os níveis de anticorpos maternos presentes no momento da imunização da criança, levando em consideração: antígenos vacinais, a dose do antígeno, a via de imunização e a idade da criança ao receber a vacina, têm sugerido que, as várias estratégias vacinais, incluindo imunização de mucosas parecem ser pouco afetadas pelos anticorpos maternos (SIEGRIST, et al., 1998).

Neonatos são capazes de produzir anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA quando expostos a antígenos (SIEGRIST, et al., 1998).

A aquisição de uma resposta completa com diversificação do repertório de anticorpos, semelhante aos adultos ocorre entre 2 e seis meses de vida para o isótipo IgM, porém um pouco mais tarde para o isótipo IgG. Todavia, os neonatos não respondem a certas bactérias capsuladas antes da idade de 2 anos, o que cria uma predisposição à infecções no momento em que desaparecem os anticorpos protetores maternos (ADKINS; GUEVARA, 2002).

Por isso, a imunização de neonatos e crianças menores de 2 anos é um campo particularmente importante, com vários desafios para a pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas, pois além destes indivíduos serem altamente susceptíveis a infecções, a eficácia de certas vacinas é baixa nesta faixa etária.

1.1.6 “Prime – booster”

A resposta primária resulta da ativação de células B não estimuladas previamente, enquanto após o “booster” ocorre uma expansão dos clones de células B de memória. Desta forma a resposta após o “booster” desenvolve mais rapidamente do que após a resposta primária, assim como a quantidade de anticorpos produzidos após o “booster” também é maior. A mudança de classe e a maturação da afinidade também aumentam com repetidas exposições aos antígenos protéicos.

Alguns autores observaram que a exposição primária de uma pessoa a alguns antígenos, com subsequente “booster” pela via parenteral, confere imunidade local, ao passo que a sensibilização inicial pela via parenteral leva a uma supressão na mucosa por um longo período de tempo (BIENENSTOCK et al, 1987, MESTECKY; MCGHEE, 1987, OGRA, 1993)

O envolvimento de linfócitos T na resposta imune à *N. meningitidis* tem sido demonstrado por meio de estudos de proliferação celular de indivíduos imunizados. Indivíduos adultos, após terem sido imunizados com a vacina norueguesa para *N. meningitidis* apresentaram significativa resposta imune dos linfócitos T, quando estes foram estimulados ‘*in vitro*’ com OMV ou com a proteína de classe 1 da cepa vacinal (B:15:P1.17,16) (NAESS et al, 1998).

1.1.7 Adjuvantes

Adjuvantes são definidos como um grupo de componentes estruturalmente heterogêneos, utilizados para se conseguir um aumento da resposta imunológica para um antígeno (STORNI et al., 2005).

As pesquisas atuais em imunização têm-se focado no estudo de adjuvantes de mucosas, entre os quais se destacam as toxinas e seus derivados (BOUVET; FISCHETTI, 1999). Isto inclui a toxina colérica (TC), a sua holotoxina (subunidade B - TCB) a toxina termo-lábil (TL) da *Escherichia coli*, lipopolissacarídeos (LPS) e microorganismos como a *Bordetella pertussis* (RYAN et al., 1999) ou componentes bacterianos (GEBARA V. et al, 2007).

Tais adjuvantes podem influenciar sobre o aspecto da resposta imune, quando administrados pelas vias de mucosas (DOUCE et al., 1999). Segundo FUKASAWA L. O. et al, 2004, o uso adequado de adjuvantes levam ao desenvolvimento de anticorpos de alta avidéz.

Os mais potentes e possivelmente mais estudados adjuvantes de mucosas até o momento são as enterotoxinas do *Vibrio cholerae* e a toxina termo-lábil da *E. coli*. O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina, componente da membrana externa de bactérias Gram negativas, pode mbém atuar como adjuvante (VERHEUL et al., 1993). Lembrando que resultados recentes indicam que os adjuvantes de mucosa em certas concentrações são inibidores ao efeito antígeno-específico. Isto, entretanto, segundo BAKKE et al, 2003, é essencial para juntar informações sobre outros determinantes que causam efeito nas vacinas intranasais, incluindo a duração de contato com a superfície de mucosa e a indução de uma memória imunológica.

Bactérias gram-negativas, como a *B. pertussis* que é o agente causador da coqueluche, patógeno exclusivamente humano, identificado como a causadora da doença meningocócica no início do século XIX e altamente contagioso por meio de gotículas de saliva e aerossóis. Possui diversos fatores de virulência que determinam a aderência ao epitélio ciliado do trato respiratório e as atividades biológicas que incluem leucocitose, mitogenic e efeitos adjuvantes.

A imunização com “whole cells” de *B. pertussis* mortas pelo calor ou a imunização com vacinas acelulares contendo *B. pertussis* confere proteção em humanos e animais (VAN DEN BAG et al, 1999). Outros estudos em animais demonstram que imunizações com “whole cells” de *B. pertussis* confere imunidade similar aos mecanismos de proteção de uma infecção natural e que as similaridades entre camundongos e homens, no andamento da infecção, com a utilização de *B. pertussis*, garante a indução da resposta imunológica (MILLS, 2001)

Particularmente, a *B. pertussis* aumenta a resposta celular, mas também estimula uma resposta humoral, induzindo a produção de anticorpos do isótipo IgG (ÉLSON; DEUTZ BAUGH, 1999).

Hougan et al, 2003, comparando os efeitos adjuvantes de Bp e TC em uma vacina nasal para *Influenza vírus* (IV) 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 w.c de *N. meningitidis* e *B.pertussis* mortas, utilizadas como adjuvantes em uma vacina nasal para IV em camundongos e observaram uma elevação nos títulos de IgG e IgA sérica e IgA na saliva dos animais imunizados. Os autores verificaram ainda, a reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos para *N. meningitidis* e *B. pertussis*.

O potencial uso de antígenos de *B.pertussis* em humanos verificado pela existência de vacinas efetivas utilizadas em crianças, a presença de antígenos de reatividade cruzada com o meningococo, à semelhança da via de contágio entre esses dois patógenos e as suas propriedades imunológicas e adjuvantes demonstra que a *B. pertussis* é importante para o estudo de adjuvantes em vacinas de mucosas para *N. meningitidis*, em especial para uso em crianças.

A vacina para *B.pertussis* foi desenvolvida utilizando células íntegras que são eficazes no controle da doença, e que continua em uso até os dias de hoje. A vacina induz uma proteção efetiva (OGRA et al, 2001; FRANCO et al., 2004).

1.1.8 Imunidade em neonatos

A sensibilidade de neonatos para as doenças infecciosas se deve parcialmente à falta de memória imunológica prévia e ao pequeno número de células presentes nos tecidos linfóides periféricos no início da vida (ADKINS et al, 2004).

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 são deficientes, mas tendem para uma resposta do tipo 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; SIEGRIST (1998) estudaram a quantidade de anticorpos maternos presentes no momento da imunização da criança, levando em consideração o tipo e a concentração 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 IgG, IgM 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 2 e 6 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).

Como a proteção contra o meningococo B é dependente do desenvolvimento de anticorpos bactericidas, 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 (POLLARD; LEVIN, 2000, JÓDAR et al, 2002).

Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de se identificar novos antígenos baseados em proteínas conservadas, capazes de induzir a produção de anticorpos de reatividade cruzada entre as diferentes cepas de *N. meningitidis* e que sejam imunogênicas em crianças menores de dois de idade (MARTIN et al, 1997, DE GASPARI, 2000, SIEGRIST, 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).

1.1.9 Resposta primária e secundária

A resposta primária, possui menor magnitude quando comparada as respostas que se manifestam após uma segunda ou subsequente exposição ao antígeno, resultando assim na ativação de células B não estimuladas previamente, enquanto a resposta secundária, é caracterizada por uma resposta mais rápida e de magnitude maior em relação à resposta primária, resultando na expansão dos clones de células B de memória. Desta forma, a resposta secundária se desenvolve mais rapidamente que a resposta primária, assim como a quantidade de anticorpos produzida durante a resposta secundária também é maior.

A primeira exposição a um microrganismo, em nossos estudos, por meio da imunização intranasal, leva à ativação de linfócitos B *naïve*, e a sua diferenciação em células produtoras de anticorpos e células de memória. Algumas das células produtoras de anticorpos migram para a medula óssea e habitam neste local, onde continuam a produzir anticorpos por anos após a eliminação do antígeno. Estima-se que mais da metade da IgG encontrada no soro de indivíduos normais é derivada dessas células produtoras de anticorpos de vida longa, as quais foram induzidas pela exposição a vários antígenos ao longo da vida do indivíduo.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, utilizando camundongos BALB/c neonatos e adultos e camundongos *outbred* neonatos imunizados com a proteína de classe 3 de *Neisseria meningitidis* B purificada, conclui-se que:

- A proteína de classe 3, quando administrada pela via intranasal e intramuscular foi capaz de induzir à produção de anticorpos dos isótipos IgG, IgM quando administrada com o adjuvante *B. pertussis* e AL [(OH)₃].
- Quando administradas pela via intranasal e intramuscularmente com a classe 3 e *B. pertussis*, somente *B. pertussis* e somente a proteína de classe 3, sem a presença de AL [(OH)₃], concluímos que houve baixa indução na produção de títulos de anticorpos dos isótipos IgG e IgM, quando comparados com os resultados obtidos com a presença de AL [(OH)₃].
- A *B. pertussis* como adjuvante mostrou-se eficaz.
- Verificamos uma diferença quanto à produção de títulos de anticorpos produzidos, a avidéz e a atividade bactericida de acordo com o número de doses.
- Os resultados sugerem que a proteína de membrana externa de classe 3 é importante na indução de imunidade de mucosa pela via de imunização nasal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Ed. 5ª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

ACHTMAN, M.; WALL, R. A.; BOPP, M.; MORELLI, G.; SAKEN, E.; HASSAN-KING, M. Variation in class 5 protein expression by serogroup meningococci during a meningitis epidemic. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 375- 382, 1991.

ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL – CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat. Rev. Immunol.** v. 4, p. 553- 564, 2004.

ADKINS B. Development of neonatal th1/th2 function. **Int. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 157– 171, 2000.

ADKINS, B.; GUEVARA P. Murine neonatal cd4+ lymph node cells are ighly deficient in the development of antigen-specific th1 function in adoptive adult hosts. **J. Immunol.**; v. 169, p. 4998– 5004, 2002.

BATISTA, F. D.; NEUBERGER, M. S. Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the i portance of off-rate. **Immunity**, v. 8, p. 751- 759, 1998.

BAKKE, H.; HAUGAN, A.; THI DAO, P. X.; GLENDE, N.; HAUGEN, I. L.; JANAKOVA, I.; BERSTAD, A. K.; HOLST, J.; HANABERG, B. *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.

BAKKE, H.; LIE, K.; HAUGEN, I. L.; ORSVOLD, G. E.; HOIBY, E. A.; NAESS, I. M.; HOLST, J.; AABERGE, I. S.; OFTUNG, F.; HANEBERG, B. Meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster responses without evidence of tolerance. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5010- 5015, 2001.

BELO, E. F. T. **Expressão antigênica de LPS das cepas meningocócicas prevalentes no Brasil, produção de anticorpos monoclonais como subsídios para estudos epidemiológicos**. 180 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BELO, E. F. T.; COUTINHO, I. M. C. C.; FERRAZ, A. S.; GASPARI, E. N. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of *neisseria meningitidis* and the distribution of this subtype in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 407 - 418, 2004.

BELSHE, R. B.; MENDELMAN, P. M.; TREANOR, J.; KING, J.; GRUBER, W. C.; PIEDRA, P.; BERNSTEIN, D. I.; HAYDEN, F.G.; KTLOFF, K.; ZANGWILL, K.; IACUZIO, D.; WOLFF, M. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, p. 1405- 1412, 1998.

BEREK, C.; MILSTEIN, C. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. **Immunol. Rev.**, v. 96, p. 23- 41, 1987.

BEREK, C.; BERGER, A.; APEL, M. Maturation of the immune response in germinal centers. **Cell.**, v. 67, p. 1121- 1129, 1991.

BERSTAD. et al. 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.

BIENENSTOCK, J.; ERNST, P. B.; UNDERDOWN, B. J. The gastrointestinal tract as an immunologic organ – satete of the art. **Ann. Allergy**, v. 59, p. 17- 20, 1987.

BORROW, R.; RICHMOND, P.; KACZMARSKI, E. B.; IVERSON, A.; MARTIN, S. I.; FINDLOW, J.; ACUNA, M., LOENGWORTH, E. O.; CONNOR, R.; PAUL, J.; MILLER, E. Meningococcal serogroup c-specific IgG antibody responses and serum bactericidal tetres in children following vaccination with a meningococcal a/c polysaccharide vaccine. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 28, p. 79- 85, 2000.

BOSLEGO, J.; GARCIA, C. J.; ZOLLINGER, W.; BRANDT, S. B.; MARTINEZ, M.; ARTHUR, J.; UNDERWOOD, P.; SILVA, W.; MORAN, E.; HANKINS, W.; GILLY, J.; MAYS, J. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal Group b (15 p1.3) outer membrane protein vaccine in iquique. **Vaccine**, v. 13, p. 821- 882, 1995.

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

BOWE, F.; LAVELLE, C.; MCNEELA, E. A.; HALE, C.; CLARE, S.; ARICO, B.; GIULIANI, M. M.; RAE, A.; HUETT, A.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G.; MILLS, K. H. G. Mucosal vaccination against serogroup b meningococci: induction of bactericidal antibodies and cellular immunity following intranasal immunization with nada of *Neisseria meningitidis* and mutants of escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Infect. Immunol.**, v. 72, p. 4052- 4060, 2004.

CARMO, M. A. S. **Estudo da imunogenicidade da proteína de classe 5C de *Neisseria meningitidis* B em camundongos imunizados pela via nasal.** 122 f. Dissertação (Mestrado em Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria) - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2004.

CAUGANT, D. A. Population genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. **APMIS**, v. 106, p. 505- 525, 1998.

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

CHEROUTRE, H. Starting at the beginning: New perspectives on the biology of mucosal T cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 217-246, 2004.

CHEROUTRE, H.; MADAKAMUTIL, L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 290- 300, 2004.

CHRISTODOULIDES, M.; BROOKS, J. L.; HECKELS, J. E. Immunization with recombinant class 1 outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*: Influence of liposomes and adjuvants on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci. **Microbiol.**, v. 144, p. 3027- 3037, 1998.

CHAPPELL, C. P.; JACOB, J. Identification of Memory B Cells Using a Novel Transgenic Mouse Model. **Infect. Immunol.**, v. 176, p. 4706- 4715, 2006.

CONCEIÇÃO, A. S. A. M.; BLAKE, M. S.; DAVID, P. R. Characterization of the Structure, function, and Conformational Stability of PorB Class 3 Protein from *Neisseria meningitidis*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 25329- 25338, 1998.

COUTINHO, L. M. C. C. **Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacáride da cepa epidêmica de B:4:p1.15 de *Neisseria meningitidis*: imunização intranasal.** 188 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

COUTINHO, L. M. C. C.; THOMAZ, B. E. F.; SENEME, F. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; DE GASPARI, E. Vacinas de mucosa: imunização intranasal para *Neisseria meningitidis*. **B. Laes Haes**, v.148, p. 52- 55, 2004.

COX, C. J.; COULTER, R. A. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, p. 248- 256, 1997.

DE GASPARI, E. N. **Em busca de uma vacina nasal contra a meningite.** Revista FAPESP, 1998. Imprensa.

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, 2000.

DE GASPARI E.N ; ZOLLINGER, W . Expression of class 5 s by meningococcal strains obtained from patients and evaluation of two new monoclonal antibodies. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 5, p. 143- 153, 2001.

DOUCE, G.; GIANNELLI, V.; PIZZA, M.; LEWIS, D.; EVEREST, P.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G. Genetically detoxified mutants of heat toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants. **Infect. Immunol.** v. 67, p. 4400- 4406, 1999.

EINAR, R.; STIG, H. L.; ODDVAR, F.; ARNE, H.; KJELL, B.; ZOLLINGER, W. D. Antibody responses to serogroup B meningococcal outer membrane antigens after vaccination and infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 1543- 1548, 1998.

ÉLSON, C. O. Cholera toxin as mucosal adjuvant. In: KI YONE, H.; OGRA, P. L.; MC GHEE, J. M. EDITORS. **Hum. Vaccin.**, San Diego, California: Academic Press, p. 59- 72, 1996.

ELSON, C.O.; DERTZ, B. M. T. Mucosal adjuvants. In: OGRA, P. I.; MESTECKY, J.; LAMM, M. E.; STROKER, W., BRIENENSTACK, J.; MC GREE, I. R. **Muc. Immunol.**, 2 nd ed. New York: Academic Press, p. 817- 838, 1999.

EVA-LIZ, J.; CHARLOTTA, B.; ANDERS, E.; CAMILLA, J.; ANN-MARI, S. Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. **Vaccine**, v. 22, p. 984- 990, 2004.

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

FERRAZ, A. S. **Avaliação da resposta imune em coelhos pela via de imunização nasal com antígenos de *Neisseria meningitidis* B selecionadas para os imunotipos L379 e L8 por meio de anticorpos monoclonais.** 2004. 96 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública) - Coordenação dos Institutos de Pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, São Paulo, 2005.

FRANCO, E.; GIAMBI, C.; IALACCI, R.; MAURICI, M. Pertussis vaccination for adolescents and adults. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 4, p. 1669- 1676, 2004.

GEBARA, V. C. B. C. **Estudo de componentes imunogênicos e adjuvantes da parede celular de *Bordetella pertussis*.** 200 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GEBARA, V. C. B. C.; RISOLÉO, L.; LOPES, A.; FERREIRA, V.; QUINTILIO, W.; LÉPINE, F.; SILVA, W. D.; RAW, I. Adjuvant and immunogenic activities of the 73 kDa N-terminal alfa-domain of BrkA autotransporter and Cpn60/60 kDa chaperonin of *Bordetella pertussis*. **Vaccine**, v. 25, p. 621- 629, 2007.

GRANOFF, D. M.; MASLANKA, S. E.; CARLONE, G. M.; PLIKAYTIS, B. D.; SANTOS, G. F.; MOKATRIN, A.; RAFF, H. Y. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal c polysaccharide that correlate with bactericidal responses. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 479- 485, 1995.

GRIFFISS, J. M.; SCHNEIDER, H.; MANDRELL, R. E.; JARVIS, G. A.; KIM, J. J.; GIBSON, B. W.; APICELLA, M. A. The immunochemistry of neisserial. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v.53, p. 501- 507, 1987.

GRIFFISS, J. M.; BRANDT, B. L.; ALTIERI, P. L.; PIER, G. B.; BERMAN, S. L. Safety and immunogenicity of group y and group w 135 meningococcal capsular polysaccharide vaccine in adults. **Infect. Immunol.**, v. 34, p. 725- 732, 1981.

HANEBERG, B.; DALSEG, R.; WEDEGE, E.; HOIBY, E. A.; HAUGEN, I. L.; OFTUNG, F.; ANDERSEN, S. R.; NAESE, L. M.; AASE, A.; MICHAELSEN, T. E.; HOLST, J. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. **Infect. Immunol.**, v.66, p. 1334- 1341, 1998.

HETHERINGTON, S. V.; LEPOW, M. L. Correlation between antibody affinity and serum bactericidal activity in infants. **J. Infect. Dis.**, v.165, p. 753- 756, 1992.

HILDE-KARI, G.; LEE, M. W.; ARE, N. Humoral immune response to the Class 3 outer membrane protein during the course of meningococcal disease. **Infect. Immunol.**, v. 61, p. 4734- 4742, 1993.

HOUGAN, A. *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.

JODAR, L.; FEAVERS, I. M.; SALISBURY, D.; GRANOFF, D. M. Development of vaccines against meningococcal disease. **Lancet**, v. 359, p. 1499- 508, 2002.

KATIAL, K. R.; 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. Immunol.**, v. 70, p.702- 707, 2002.

KLEIJN DE, E. D.; GROOT DE, R.; LAFEVER, A. B.; LABADIE, J.; LIMPT, C. J. P.; VISSER, J.; BERBERS, G. A. M.; ALPHEN, L. Y.; RUMKE, H. C. Prevention of meningococcal serogroup b infections in children: protein-based vaccine induces immunologic memory. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 98- 102, 2001.

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

KUNO-SAKAI, KIMURA, K. M.; OHTA, K.; SHIMOJINA, R.; FUKUMI, H. Developments in mucosal influenza virus vaccines. **Vaccine**, v. 12, p. 1303-1308, 1994.

KUNKL, A.; KLAUS, G. G. B. The generation of memory cells iv. immunization with antigen-antibody complexes accelerates the development of b-memory cells, the formation of germinal centres and the maturation of antibody affinity in the secondary response. **Immunology**, p. 371- 378, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, p. 680- 685, 1970.

LEHMANN, A.; HALSTENSEN, I. S.; AABERGE, J.; HOLST, MICHAELSEN, T. E.; SORNES, S.; WETZLER, L. M.; GUTTORMSEN, H. K. Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PORa and PORb. **Infect. Immunol.**, v. 67, p. 2552- 2560, 1999.

FUKASAWA, L. O. **Desenvolvimento de uma vacina conjugada antimeningocócica sorogrupos B/C**. 220 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FUKASAWA, L. O.; WALDELY, O. D.; SCHENKMAN, R. P. J.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. Adjuvant can improve protection induced by OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroups B/C in neonatal mice. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 41, p. 205- 210, 2004.

GEORGINA, T.; FANI, M.; KONSTANTINOS, K.; STAMATINA, L.; ANASTASIA, P.; MARIZA, T.; VASSILIKI, L.; ELENI, P.; ALIKI, V.; ATHINA, K.; MARIA, F.; CAROLINE, B.; JENNY, K. Phenotypic assesment of *Neisseria meningitidis* isolates obtained from patients with invasive meningococcal disease in Greece, 1993-2003: implications for serogroup B vaccines based on PorA serosubtype antigens. **Vaccine**, v. 24, p. 819- 825, 2006.

HEYDERMAN, R. S, VICTORIA, D.; NEL, A. W. Mucosal immunity and optimizing protection with meningococcal serogroup B vaccines. **Trends Microbiol**, In press. 2006.

MARGARET, C. B.; KRYSTYNA, B. L.; SUSAN, D. B.; CARL, E. F. Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer Membrane protein variable regions and type identification using genetic techniques. **Infect. Immunol.**, v. 63, p. 1484-1490, 1995.

MASLANKA, S. E.; GHEESLING, I. I.; LIBUTTI, D. E.; DONALDSON, K. B.; HHARAKEH, H. S.; DYKES, J. K.; ARHIN, F. F.; DEVI, S. J.; FRASCH, C. E.; HUANG, J. C.; KNIZ-KEIZEMENSKA, P.; LEMMON, R. D.; LORANGE, M.; PEITERS, C. C.; QUATAERT, S.; TAI, J. V.; CARBONI, G. M. Standardization and a multilaboratory comparison of *neisseria meningitidis* serogroup b and c serum bactericidal assays the multilaboratory study group. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 4, p. 156-67, 1997.

MAZZA, C. C.; GALVÃO, P. A. A.; FOCACCIA, R. Doença meningocócica. In: Veronesi R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Ed 8ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 498- 505.

MC GHEE, J. R.; LAMM, M. E.; STROBER, W. Mucosal immune responses: An Overview, p. 485-506, 1999. In p. I. OGRA, J.; MESTECKY, M. E.; LAMM, W.; STROBER, J.; BIENENSTOCK, J. R.; MCGHEE (ed.), **Chem. Immunol.** v. 2. Academic Press, 1999.

MERKER, P.; TOMMASSIN, J.; KUSECEK, B.; VIRJI, M.; SESAROLIC, D.; ACHTMAN, M. Two-dimensional structure of the *opc* invasin from *Neisseria meningitidis*. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 281- 293, 1997.

MESTECKY, J.; MC GHEE, J. R. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. **Adv. Immunol.** v. 40, p. 153- 245, 1987.

MILLS, K. H. G. Immunity to *Bordetella pertussis*. **Micr. Infect.**, v. 3, p. 655-677, 2001.

MORLEY, S. I.; COLE, M. J.; ISON, C. A.; CAMARAZA, M. SOTOLONGO, F.; AWAR, N.; CUEVAS, J.; ERO, M.; CAMPA, H. C.; SIERRA, G.; LEVIN, M. Immunogenicity of a serogroup b meningococcal vaccine multiple *Neisseria meningitidis* strains in infants. **Pediatric Infect. Dis. J.**, v. 20, p. 1054-1061, 2001.

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

NAESS, L. M.; OFTUNG, F.; AASE, A.; WETZLER, L. M.; SANDIN, R.; MICHAELSEN, T. E. Human T-cell responses after vaccination with the Norwegian group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immunol.** p. 959- 965, 1998.

NEUBERGER, M. S.; EHRENSTEIN, M. R.; RADA, C.; SALE, J.; BATISTA, F. D.; WILLIAMS, G.; MILSTEIN, C. Memory in the B-cell compartment antibody affinity maturation. **Transplantation**, v. 29, p. 355- 357, 2000.

OGRA, P. L. Global eradication of poliomyelitis: reinvent the wheel or use existing options effectively? **Public Health Rev.**, v. 21, p. 143-150, 1993.

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

OLIVEIRA, L. S. O.; AÊREAS, A. P. M.; LEE, H. O. P. Intranasal vaccines for protection against respiratory and systemic bacterial infections. **Expert Rev. Vaccines**, v. 6, p. 419- 429, 2007.

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

POLLARD, A. J.; GALASSINI, R.; ROUPPE VAN DER VOORT, E. M.; HIBBERD, M.; BOOY, R.; LANGFORD, P.; NADEL, S.; ISON, C.; KROLL, J. S.; POOLMAN, J.; LEVIN, M. Cellular immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. **Infect. Immunol.**, v. 67, p. 2452- 2463, 1999.

POLLARD, A. J.; LEVIN, M. Vaccines for prevention of meningococcal disease. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 19, p. 333- 344, 2000.

RAJEWSKY, K. Clonal selection and learning in the antibody system. **Nature**, v. 381, p. 751- 758, 1996.

RYAN, E. J.; MC NEELA, E.; MURPHY, G. A.; STEWART, H.; O'HAGAN, D.; PIZZA, G. A.; RAPPUOLI, M.; RILLS, K. H. Mutants of escherichia coli heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular vaccine: differential effects of the montoxic ab compl and enzyme activity on th1 and th2 cells. **Infect. Immunol.** v. 67, p. 6270- 6280, 1999.

RICHMOND, S. A.; LINDSTROM, J. E.; BRADDOCK, J. F. Assesment of natural attenuation of chlorinated aliphatics and BTEX in subarctic groundwater. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, n. 20, p. 4038- 4045, 2001.

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.

SAUNDERS, B. N.; SHOEMAKER, D. R.; BRANDT, B. L.; MORAN, E. E.; LARSEN, T.; ZOLLINGER, W. D. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 113- 119, 1999.

SCHOLTEN, R. J.; KUIPERS, B.; VALKENBERG, H. A.; DANKERT, J.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Lipo-oligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *Mol. Gen. Genet.*, v. 245, p. 96- 106, 1994.

SIEGRIST, C. A.; BARROS, C.; MARTINEZ, X.; BRANDT, C.; BERNEY, M.; CORDONA, M.; KOVARIK, J.; LAMBERT, P. H. Influence of maternal antibodies on vaccine responses inhibition of antibody but not t cell responses allowss successful early prime-boost strategies in mice. *Eur. J. Immunol.*, v. 28, p. 4138- 4148, 1998.

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

SILVA JUNIOR, F. C.; GIOIA, C. A. C.; OLIVEIRA, J. M.; CRUZ, S. C.; FRASCH, C. E.; MILAGRES, L. G. Differential capacities of outer membrane proteins from *Neisseria meningitidis* B to prime the murine immune system after vaccination. *Scand. J. Immunol.*, v. 65, p. 1- 7, 2007.

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

STAATS, H. F.; JACKSON, R. J.; MARINARO, M.; TAKAHASHI, I.; KIYONO, H.; MC GHEE, J. R. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr. Opinion Immunol.*, v. 6, p. 572- 583, 1994.

STORNI, J.; KUNDIG, T. M.; SEN, G.; VOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen derived systems. *Adv. Drug. Deliv.*, v. 578, p. 333- 355, 2005.

THOMAS, M. G. Prevention of group b meningococcal disease by vaccination: a difficult task. *N. Z. Med. J.*, v. 117, p.1016, 2004.

THOMPSON, A. S.; 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.

TUNES, C. F. **Imunização nasal em coelhos com *Neisseria lactamica*: importância dos antígenos de reatividade cruzada.** 2005. 152 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VAN PUTTEN, J. P.; ROBERTSON, B. D. Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in *Neisseria*. **Mol. Microbiol.**, v. 16, p. 847- 853, 1995.

VERHEUL, A. F.; VAN GAANS, V. A.; WIERTZ, E. J.; SNIPPE, H.; VERHOEF, J.; POOLMAN, J. T. Meningococcal lipopolysaccharide (lps)-derived oligosaccharide-protein conjugates evoke outer membrane protein-but not LPS-specific bactericidal antibodies in mice influence of adjuvants. **Infect. Immunol.**, v. 61, p. 187- 196, 1993.

VERMONT, C. L.; VAN DIJKEN, H. H.; VAN LIMPT, C. J.; DE GROOT, R.; VAN ALPHEN, L.; VAN DENDOBDELSTEEN, G. P. Antibody avidity and immunoglobulin g isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal b outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immunol.**, v. 70, p. 584- 590, 2002.

WALKER, R. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. **Vaccine**, v. 12, p. 387- 400, 1994.

WATANABE, M.; NAGAI, M. Role of systemic and mucosal immune responses in reciprocal protection against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection. **Infect Immunol.**, v. 19, p. 159- 161, 2004.

WOODS, A.; MUNDAY, M. R.; SCOTT, J.; YANG, X.; CARLSON, M.; CARLING, D. Yeast snf 1 is functionally related to mammalian amp-activated protein kinase and regulates acetyl-coa carboxylase in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 19509- 19515, 1994.

WRIGHT, C.; WILLIAMS, J. N.; CHRISTODOULIDES, M.; HECKELS, J. E. Immunization with the recombinant PORB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immunol.**, v. 70, p. 4028- 4034, 2002.

WU, H. Y.; BASKIN, L. S.; BLAKEY, C.; GOODMAN, J.; CUNHA, G. R. Ultrastructural smooth muscle ontogeny of the blood vessel. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 462, p. 93- 102, 1999.

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. Immunol.** v. 65, p. 1053- 1060, 1997.