TULIO NAKAZATO DA CUNHA

ESTUDO DA IMUNOGENICIDADE DE ANTÍGENOS DE
Neisseria meningitidis:
UTILIZAÇÃO DE TOXÓIDE COMO ADJUVANTE,
VETORIZADO EM LIPOSSOMAS, NO MODELO
CAMUNDONGO

Tese apresentada ao Programa Interunidades
em Biotecnologia USP/ IPT/ INSTITUTO
BUTANTAN, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2008

TULIO NAKAZATO DA CUNHA

ESTUDO DA IMUNOGENICIDADE DE ANTÍGENOS DE
Neisseria meningitidis:
UTILIZAÇÃO DE TOXÓIDE COMO ADJUVANTE,
VETORIZADO EM LIPOSSOMAS, NO MODELO
CAMUNDONGO

Tese apresentada ao Programa Interunidades
em Biotecnologia USP/ IPT/ INSTITUTO
BUTANTAN, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Natal De
Gaspari

São Paulo
2008

RESUMO

CUNHA, T.N. **Estudo da imunogenicidade de antígenos de *Neisseria meningitidis***: utilização de toxóide como adjuvante, vetorizado em lipossomas, no modelo camundongo. 85 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

N.meningitidis é diplococcus gram-negativo, patógeno estritamente humano que apresenta membrana externa, com lipídios, proteínas (OMP) e lipopolissacárides. Este patógeno tem sido uma das principais causas da meningite bacterina. Este trabalho buscou usar o toxóide (STX2) de *Escherichia coli* como adjuvante com proteínas da membrana externa do meningococo (OMP) transportados em lipossomas. A nova preparação antigênica induziu a produção de altos títulos de anticorpos IgG, mesmo após um ano e de alta avidéz. O modelo usando lipossomas contribuiu diminuindo a toxicidade da preparação antigênica quando administrada pela via intramuscular reduzindo assim os riscos para idosos e crianças e também, em imunizações de longo termo, com grande vantagem aos sistemas tradicionais.

Palavras-chave: Antígenos de membrana externa de *Neisseria*, Meningite, Toxóide como adjuvante, *Escherichia coli*, Modelo camundongo, Lipossoma.

ABSTRACT

CUNHA, T.N. ***Neisseria meningitidis* antigens immune response study:** toxoid as mice model adjuvant encapsulated in liposomes. 85 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

N.meningitidis is diplococcus gram-negative strict human pathogen that similarly to other bacteria are surrounded by external membrane with lipids, proteins (OMP) and LPS. It has been one of the main causes of the meningitidis and other invading infections in the world. This work challenged STX2 toxoid of *Escherichia coli* as adjuvant for a possible and future vaccine model and as antigenic stimulant proteins of the outer membrane of meningococci (OMP) carried in liposomes. Differences in the production of IgG antibodies gotten between the mice each one of the 3 bleedings had been observed after but not how much to the avidity index. The new antigenic preparation unchained one high heading exactly after one year of 1st immunization stimulated the production of antibodies for other sites of linking and served as “protection” to the residual LPS of the processes with deoxicolate of the OMP diminishing toxicity of intramuscular preparation reducing the aged risks for and very small children e also, in immunizations of long term with great advantage to the traditional systems.

Key words: Outer membrane antigens of *Neisseria*, Meningitis, Toxoid as Adjuvant, *Escherichia coli*, Mouse model, Liposome.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis é um diplococcus gram-negativo, patógeno estritamente humano que, similarmente a outras bactérias Gram negativas, é circundado por uma membrana externa, composta por lipídios, proteínas (OMPs) e lipopolissacarídeos (LPS) e são envolvidos por uma cápsula polissacarídica, associada à esta membrana externa.

A bactéria *N.meningitidis* é um colonizador eficiente da região da nasofaringe humana geralmente, levando à consequência nasofaríngea assintomática, porém, por ocasião pode ocorrer doença invasiva. (GREENFIELD *et al.*, 1971; CAUGANT *et al.*, 1994; APICELLA, 2005; HARRISON, 2006). Uma característica impressionante do meningococcus é sua grande variabilidade genética conseguida através de recombinação, que dá a este microorganismo a habilidade de rapidamente se adaptar em resposta as pressões seletivas. (FEIL *et al.*, 2000; 2001; JOLLEY *et al.*, 2005)

Este microorganismo é um habitante comum da mucosa do trato respiratório superior humano e sua transmissão é feita através do contato de pessoas sadias com secreções nasofaríngeas, principalmente dos portadores assintomáticos. (RAFF *et al.*, 1988; DEVI *et al.*, 1991)

1.2. Principais fatores de virulência

Na membrana externa existem os lipopolissacarídeos, que são endotoxinas e diversas proteínas, envolvidas na patogênese: aderem às células do hospedeiro, causam lesão tecidual e inibem o transporte de proteínas. (MORLEY e POLLARD, 2002) A membrana externa é revestida por uma cápsula de polissacarídeos essencial para a patogenicidade, tendo em vista que confere resistência contra a

fagocitose e lise mediada por complemento, além de oferecer proteção contra agravos do meio ambiente. (MORLEY e POLLARD, 2002) Existem variações na composição do polissacarídeo, que têm implicação na patogenicidade da bactéria e no desenvolvimento de imunidade. (MORLEY e POLLARD, 2002) Assim sendo, o polissacarídeo da cápsula constitui o principal antígeno da *Neisseria meningitidis* e determina a classificação da bactéria em 13 sorogrupos - A, B, C,D, 29E, H, I, K, L, W-135, X, Y e Z. (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2000). Os meningococos dos sorogrupos A, B, C, Y e W-135 são os causadores da doença meningocócica. (LEPOW, 1999). Estima-se que 90% dos casos endêmicos e epidêmicos sejam causados pelas bactérias dos sorogrupos A, B e C.

1.3. A doença meningocócica

A *N. meningitidis* tem sido apontada como uma das principais causas da meningite e de outras infecções bacterianas invasoras, nos Estados Unidos e também, no mundo inteiro (ROSENSTEIN, 2001; MOORE, 1992). O papel do meningococcus como um causador da meningite bacteriana tornou-se mais pronunciado nos últimos anos, com os declínios dos casos de meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b e *Streptococcus pneumoniae* por conta da introdução de novas vacinas conjugadas (Adams, 1993; HARRISON, 2006).

Anteriormente à 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. (DE GASPARI e ZOLLINGER, 2001; JÓDAR *et al.*, 2002; MORLEY e POLLARD, 2002).

No Brasil, mais propriamente Estado de São Paulo, no período dos últimos 10 anos, a taxa de letalidade da doença foi de 18,8%. Entre os sobreviventes, cerca de 10 a 20% desenvolvem seqüelas neurológicas permanentes, tais como

epilepsia, retardo mental e surdez. (JODAR *et al.*, 2002; MORLEY e POLLARD, 2002)

1.4. Busca à vacina

Até o momento, um dos principais desafios na doença meningocócica têm sido a busca de uma prevenção eficaz através da imunoprophilaxia contra a *Neisseria meningitidis* B. Há tempos que vêm se buscando uma preparação vacinal com grande aceitação e, o mais importante, segura e eficaz. Países como Brasil, Cuba, Canadá, USA, Holanda e Noruega, que tiveram epidemias durante as duas últimas décadas, têm investido bastante em pesquisas para vacina contra a doença meningocócica do sorogrupo B. (POOLMAN, 1995; PELTOLA, 1998; DE GASPARI, 2000).

Crianças recém-nascidas são altamente resistentes à 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 seis meses de idade. Dos 2 aos 12 anos há um aumento progressivo do título de anticorpos bactericidas contra a doença. GOLDSCHENEIDER *et al.*, 1969, observaram que a imunidade diminui entre 6 meses e 12 meses de idade e mostraram que o nível de anticorpos bactericidas é idade-dependente; isto é, conforme aumenta a idade, os níveis de anticorpos diminuem.

1.5. Vacinas antimeningocócicas existentes

A doença meningocócica invasiva ocorre em pacientes com deficiência de anticorpos bactericidas e/ou opsonizadores, conseqüentemente, a melhor forma de prevenir a doença é a indução à produção destes anticorpos pela vacinação.

Nos anos 60, foram desenvolvidas vacinas polissacarídicas baseadas nas cápsulas dos sorogrupos A e C (GOTSCHLICH *et al.*, 1969). No momento está disponível uma vacina quadrivalente contendo os grupos A, C, W-135 e Y (LEPOW *et al.*, 1999). A vacinação tem sido efetiva no combate a surtos comunitários e epidemias em centros militares (ROSENSTEIN *et al.*, 2001). De maneira similar, essa vacina é capaz de controlar grandes epidemias em países da África, situados no chamado “cinturão da meningite”, promovendo segurança adequada (VEEKEN *et al.*, 1998). Porém, em estudos com vacinação de viajantes, verificaram que a vacinação contra tais sorogrupos não reduz a transferência da bactéria de indivíduos para indivíduos. PELTOLA *et al.* (1998) e CEESAY *et al.* (1993) questionam o valor dessas vacinas polissacarídicas, demonstrando que além de não induzirem memória imunológica são pouco imunogênicas em crianças menores de dois anos de idade. A indução de memória imunológica e uma maior eficácia em crianças podem ser alcançadas pela conjugação da vacina polissacarídica a uma proteína (FRASCH, 1989). A eficácia destas vacinas, recentemente desenvolvidas, numa vacinação em massa está sob investigação. A principal desvantagem das vacinas disponíveis nos países do oeste europeu é a ausência de atividade contra os meningococos do grupo B, já que o polissacarídeo do sorogrupo B é um resíduo do homopolímero de ácido N-acetilneuramínico (poly α 2-8NeuNAc) que mimetiza moléculas de adesão de células neuronais humanas (Griffiss *et al.*, 1991) tornando o uso da cápsula do grupo B em uma vacina passível de indução à autoimunidade.

1.6. Vacinas antimeningocócicas em desenvolvimento

Em nosso laboratório, COUTINHO, 2002; FERRAZ, 2005; CARMO, 2006; RAPHAEL, 2008 avaliaram a especificidade e a capacidade protetora dos anticorpos induzidos em modelo animal com antígenos de membrana externa de *N.meningitidis* de cepas epidêmicas de *N.meningitidis* como também, de outras espécies de *Neisseria*. (TUNES, 2006; 2008; SERAFIM, 2008; TUNES *et al*.,2008;ITO *et al.*,2009).

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 (MORLEY e POLLARD, 2002). O que abre a possibilidade para uma possível vacina constituída por proteínas da membrana externa (*outer membrane protein*) ou OMP. As OMP das classes 2 e 3 determinam o sorotipo da cepa, a OMP de classe 1 estabelece o subtipo (BRICKS, 2002).

1.6.1. Vacinas de Lipopolissacarídeos

Diversas pesquisas têm demonstrado que imunotipos específicos, tais como o L3,7,9 estão associados à cerca de 80% dos casos de doença meningocócica do tipo B invasiva (POLLARD e FRASCH, 2001). Neste contexto, têm-se desenvolvido vacinas conjugadas baseadas em lipooligossacarídes de imunotipos L3,7,9 detoxificado (dLOS) e conjugado a proteínas carreadoras, tais como o toxóide tetânico ou vesículas de membrana externa do meningococo B, com resultados variados, de acordo com o animal experimental utilizado. No

entanto, existem alguns fatores limitantes no desenvolvimento de vacinas baseadas em LPS que consistem de, no processo de detoxificação, ocorrer a destruição dos epítomos necessários para a ligação de anticorpos bactericidas (ZOLLINGER *et al.*, 1997) ou ainda, o risco de auto-imunidade, pela semelhança da estrutura antigênica da molécula e células endoteliais e epiteliais humanas.(POOLMAN, 1995; ZOLLINGER *et al.*, 1997).

A eficácia reduzida na prevenção da doença meningocócica no Brasil e os custos elevados da vacina VA-MENINGO-BC® encorajaram a elaboração de um projeto nacional para o desenvolvimento de uma vacina contra *N. meningitidis* B (Milagres *et al.*, 1996). Até o momento, vacinas contendo OMVs de 2 a 4 cepas representativas dos sorotipos e subtipo prevalentes no país foram testadas em camundongos. Os resultados desses experimentos demonstram que tais preparações vacinais são altamente imunogênicas e indicam que o Lipooligossacáride detoxificado (Dlos) apresenta uma função importante na exposição dos antígenos da membrana externa.

1.6.2 Vacinas baseadas em outros componentes da membrana externa

A proteína ligante de transferrina (Tbp), expressa na superfície dos meningococos em condições de baixa disponibilidade de Ferro. (POLLARD e FRASCH, 2001, JÓDAR *et al.*, 2002) Estudos têm demonstrado que a subunidade Tbp2 purificada de OMVs é imunogênica, induzindo produção de anticorpos com atividade bactericida (ZOLLINGER *et al.*, 1997). Já estudos de fase I com vacinas baseadas em Tbp 2 recombinantes demonstraram a indução de altos títulos de anticorpos IgG, porém sem atividade bactericida (JÓDAR, 2002).

MARTIN *et al.*,1997 descreveram uma proteína entre 18 e 22kDa da membrana externa da *N. meningitidis* denominada NspA, “*Neisserial surface protein A*”. Esta proteína é altamente conservada e está presente na maioria das

cepas de meningococos analisadas. Os experimentos de proteção à doença conferida por meio de imunização com essa proteína purificada demonstraram que cerca de 80% dos animais foram protegidos da doença. Outros estudos mostraram que essa proteína é capaz de induzir a produção de anticorpos por meio de imunização passiva em animais neonatos protegendo-os contra cepas meningocócicas (MARTIN *et al.*, 1997). Entretanto, apesar de se comportar como um bom imunógeno para ser incluído em uma vacina antimeningocócica existe a necessidade da inclusão de outros antígenos para induzir uma proteção efetiva.

FLETCHER *et al.*, 2004 descreveram recentemente uma lipoproteína - LP 2086, presente na superfície dos meningococos dos sorogrupos A, B, C, Y e W-135. Essa lipoproteína possui duas variantes de acordo com a seqüência de aminoácidos que são capazes de induzir anticorpos bactericidas contra várias cepas de meningococo.

DE GASPARI, 2000, utilizando anticorpos monoclonais, descreveu uma nova proteína de 50 kDa de membrana externa de *N. meningitidis*, demonstrando que esta proteína tem alta expressão em diferentes sorogrupos de meningococos e apresenta reatividade cruzada com diversas bactérias Gram negativas, tal como a *N. lactamica*, *B. pertussis*, *H. influenzae* e *E. coli*. Em trabalhos recentes, utilizando modelo camundongo (COUTINHO, 2002) ou modelo coelho (BELO *et al.*, 2005) foi demonstrado que a proteína de 50 kDa se apresentou altamente imunogênica quando presentes em diferentes preparações antigênicas em combinação com NOMV (*native outer membrane vesicles*) de *N. meningitidis* B pela via intranasal. Reforçando uma das questões que mais intrigam na doença meningocócica que é a presença dos portadores assintomáticos que é atribuída dentre outras razões, à imunidade induzida por estas proteínas semelhantes a outras cepas não patogênicas ou de outras bactérias gram-negativas, como a *E.coli*, que tem estrutura muito semelhante à do meningococo (DEVI *et al.*, 1991; RAFF *et al.*, 1988).

1.6.3. Adjuvantes

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 (ÉLSON 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*, 1996). 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).

A toxina colérica como adjuvante

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 (ÉLSON 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 (ÉLSON, 1996).

De maneira contrária à maioria dos antígenos protéicos, a TC não induz tolerância pela administração oral e induz memória imunológica, fato que pode ser presumidamente aplicado à imunização de outros sítios de mucosas. A adjuvantividade da TC parece estar relacionada com a sua imunogenicidade (ÉLSON 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 (1996) 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 da toxina.

Os efeitos adjuvantes da TC estão associados com a indução de fosforilação 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 (VERHEUL *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 (ÉLSON, 1996).

O LPS como adjuvante para uso em vacinas

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 lípide A e a produção de mutantes (sem o lípide 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 lípide A. VERHEUL *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 lípide 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 (ÉLSON e DEUTZBAUGH, 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 (ÉLSON e DEUTZBAUGH, 1999). Adicionalmente, quando o LPS é administrado pela via nasal, perde o seu efeito tóxico (KATIAL *et al*, 2002).

O uso de bactérias como a *Bordetella pertussis* como adjuvante

B. pertussis (Bp) 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 (ÉLSON 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*. Também DE GASPARI (2000) com pesquisas com o anticorpo monoclonal 8C7Br1 do isótipo IgM, verificou que esse AcM reconheceu epítomos de *N. meningitidis* e reagiu de maneira cruzada com outros microrganismos Gram negativos, inclusive com 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.

1.6.4. Toxinas

Toxinas são substâncias - geralmente proteínas - sintetizadas por bactérias patogênicas que, direta ou indiretamente, danificam, inativam ou destroem um ou mais componentes vitais das células do hospedeiro. Proteínas bacterianas com ação tóxica e que são secretadas em baixas concentrações são denominadas exotoxinas. Outras substâncias tóxicas não-protéicas, como o lipopolissacarídeo ou LPS, componente estrutural das membranas externas das bactérias Gram-negativas e denominado de endotoxina não utilizam um mecanismo enzimático para danificar as células do hospedeiro e são ativas em concentrações muito menores. (FINLAY e FALKOW,1997)

Exotoxinas

As exotoxinas têm função central na patogênese bacteriana. Toxinas purificadas podem causar a maioria das características clínicas de diarreias, cólera, tétano e difteria. Contudo, outras funções bacterianas potencializam sua expressão, liberação e efeitos no hospedeiro. Essas funções incluem mecanismos reguladores associados a outros fatores de virulência e maquinaria bioquímica especializada que secretam as toxinas. Fatores de colonização aproximam

bactérias e células hospedeiras de modos a liberar toxinas no seu alvo celular específico. Portanto, embora a toxina colérica possa sozinha causar muitos dos sintomas da cólera, uma adesina é necessária para a plena expressão da virulência da bactéria. (MORETTI, 2007)

Toxinas bacterianas podem também ter outras funções que facilitam a virulência, em adição à toxigenicidade; a toxina de *Bordetella pertussis*, agente causal da coqueluche, parece facilitar a aderência da bactéria às células do hospedeiro.

Toxinas A-B

Muitas toxinas bacterianas compartilham homologia estrutural e características funcionais comuns. Muitas toxinas exibem uma estrutura "A-B". Uma toxina A-B têm dois componentes: a subunidade ou domínio B que media a adesão a um receptor na superfície da célula hospedeira e facilita a liberação da toxina na célula e a subunidade ou domínio A que contém a atividade enzimática e eventualmente tóxica para a célula. (FINLAY e FALKOW,1997)

A atividade enzimática da subunidade A varia entre as diversas toxinas podendo apresentar atividade ADP-ribosilante (Ex.: toxinas da cólera, difteria e coqueluche) ou atividade proteolítica (Ex.: toxinas do tétano e do botulismo).

Embora o domínio B varie entre as diferentes toxinas bacterianas, presumivelmente para conferir especificidade de hospedeiro e tecido, parte do domínio A são freqüentemente conservadas, especialmente as regiões críticas para a atividade enzimática, como acontece com as toxinas ADP-ribosilantes de *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* e toxina A de *Pseudomonas*. Similaridades estruturais são também encontradas nas subunidades B. A toxina colérica e a enterotoxina termolábil de *E. coli* têm cinco subunidades B idênticas. A toxina "Shiga-like" de *E.coli* (que pertence à família das toxinas de *Shigella*) não apresenta nenhuma homologia de seqüência com a toxina colérica. Contudo, as estruturas moleculares dessas duas toxinas são bastante similares, sugerindo uma ligação evolucionária distante. (FINLAY e FALKOW,1997)

Toxinas Proteolíticas

Doenças diferentes podem ser causadas por toxinas semelhantes liberadas em diferentes partes do corpo. A toxina botulínica, produzida por *Clostridium botulinum*, e a toxina tetânica, produzida por *Clostridium tetani*, são proteínas altamente similares. Ambas têm o mesmo mecanismo de ação que é o bloqueio da liberação de neurotransmissores pela clivagem proteolítica das sinaptobrevinas, proteínas componentes das vesículas sinápticas. Contudo, a toxina botulínica é ingerida oralmente e atua nos nervos periféricos causando paralisia por relaxamento muscular e a toxina tetânica é liberada em ferimentos profundos colonizados por *C. tetani* e atua no sistema nervoso central provocando paralisia espasmódica. Parece que o modo e o local de liberação contribuem para as diferentes doenças causadas por essas duas neurotoxinas. (MORETTI, 2007)

A extraordinária similaridade da toxina tetânica com a toxina botulínica sugerem que diferenças na manifestação de doenças não dependem, obrigatoriamente, de diferenças na estrutura de toxinas ou de outro fator de virulência. (FINLAY e FALKOW, 1997)

Toxinas formadoras de poros

Existem proteínas que se inserem na membrana plasmática da célula hospedeira e causam a formação de canais ou poros que provocam a lise da célula. Existem várias famílias de toxinas formadoras de poros tais como a grande família de citolisinas encontradas em muitos organismos Gram-positivos e a grande família RTX cujas toxinas são encontradas em muitos patógenos Gram-negativos. Um membro representativo das citolisinas é a listeriolisina que media o escape de *Listeria monocytogenes* de um vacúolo no interior da célula hospedeira, por lisar o fagossomo. O membro representativo da família RTX é a hemolisina A de *E. coli* (HlyA). Outros membros da família RTX incluem uma adenilato ciclase de *B. pertussis* e a leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*. (MORETTI, 2007)

Embora as seqüências de aminoácidos e os mecanismos gerais de formação de poros pareçam ser conservados na RTX, a especificidade por hospedeiro e células alvo variam entre as diversas toxinas dessa família, contribuindo para a especificidade da doença. Esta família de toxinas também,

compartilha o mesmo mecanismo de secreção responsável pelo transporte de toxinas para fora da bactéria. (MORETTI, 2007)

Conquanto haja uma grande quantidade de toxinas bacterianas elas não são tão diversas. Há um número limitado de famílias de toxinas cujos membros exibem características estruturais e funcionais comuns. Embora a associação de uma toxina à uma família seja mais freqüentemente determinada pela homologia de seqüência de aminoácidos a outras proteínas de uma família, o estabelecimento das estruturas terciárias pode prover informações importantes sobre o relacionamento de uma toxina a outras de uma determinada família. Uma vez que exotoxinas são secretadas, a conservação dos vários mecanismos de secreção são também importantes na determinação da família de uma toxina. (FINLAY e FALKOW, 1997)

Endotoxina

As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que envolve a parede celular. A estrutura dessa membrana apresenta uma camada fosfolipídica voltada para a parede celular e uma camada superposta constituída de um lipopolissacarídeo ou LPS. A porção lipídica do LPS está voltada para o interior da membrana. A porção polissacarídica consiste em um polissacarídeo principal - constituído de açúcares de 6, 7 e 8 carbonos - e um polissacarídeo "O" (constituído de açúcares de 6 carbonos) que se projeta da a superfície da célula.

Os açúcares nas cadeias polissacarídicas variam entre diferentes organismos e entre linhagens de uma mesma espécie de bactéria. O polissacarídeo "O" do LPS é um importante determinante antigênico, agrupando as bactérias Gram-negativas em diferentes sorogrupos "O", sendo . O polissacarídeo "O", também denominado de antígeno O ou antígeno somático, tem sido importante fator de determinação antigênica de linhagens patogênicas de E. coli. (MORETTI, 2007)

A porção lipídica - o lipídeo A - apresenta um arcabouço diferente daquele dos fosfolipídeos da membrana plasmática e o tipo de ácido graxo difere entre diferentes linhagens bacterianas. O LPS parece contribuir com a consistência da membrana externa.

O LPS é tóxico e é denominado de endotoxina. Fragmentos de LPS liberados durante infecções por bactérias Gram-negativas são responsáveis por manifestações clínicas análogas às causadas por fragmentos da parede celular de bactérias Gram-positivas, tais como inflamação, febre e choque séptico.

Estudos sugerem que grande parte da toxicidade de *Neisseria meningitidis* (agente causativo de septicemia e meningite) decorre da liberação de endotoxina na forma de protuberâncias membranosas denominadas de "blebs". Todos os patógenos Gram-negativos liberam endotoxina embora sua toxicidade varie entre espécies. (FINLAY e FALKOW, 1997)

1.6.5. *Escherichia coli*

Entre os bacilos Gram negativos anaeróbicos facultativos, constituintes da microbiota intestinal do homem e dos animais, *Escherichia coli* é a espécie comensal predominante e apresenta um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal e no controle do crescimento de outros microorganismos. Entretanto, algumas cepas podem causar doenças intestinais ou extra-intestinais, tanto no homem como nos animais. (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995)

Apesar das evidências sugerirem uma forte associação entre *E.coli* e a diarreia infantil, somente na década de 40 estes microorganismos foram reconhecidos como enteropatogênicos e assim, importante causador de doença diarreica na criança.

Atualmente, existem seis grupos reconhecidos de *E. coli* patogênicas, referidas como EEC, que causam gastroenterites em humanos: as enteropatogênicas, as enterotoxigênicas, as enteroinvasivas, as enterohemorrágicas, as enteroagregativas e as difuso-aderentes. No grupo das enterohemorrágicas (STEC), a *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais comum e mais estudado. A combinação de letras e números no nome da bactéria se refere aos

marcadores específicos encontrados em sua superfície e isto as distingue de outros sorotipos de *E. coli*. Os conhecimentos atuais sugerem que, ao longo do tempo, a *E. coli* foi infectada por um vírus que inseriu seu DNA no cromossomo da bactéria e um de seus genes passou a conter a informação para a produção de toxina "Shiga-like" (Stx). Estas toxinas, também chamadas verotoxinas, estão intimamente relacionadas, em estrutura e atividade à toxina produzida pela *Shigella dysenteriae*, daí o nome. A patogênese da infecção tanto pela *E. coli* O157:H7 quanto por outras *E. coli* enterohemorrágicas não está completamente compreendida. As propriedades virulentas envolvidas são distintas daquelas de outros grupos de *E. coli*. (GRIFFIN, 1991)

A *Escherichia coli* sorotipo O157:H7, tida como uma bactéria emergente, causa um quadro agudo de colite hemorrágica, através da produção de grande quantidade de toxina, provocando severo dano à mucosa intestinal. O quadro clínico é caracterizado por cólicas abdominais intensas e diarreia, inicialmente líquida, mas que se torna hemorrágica na maioria dos pacientes. Ocasionalmente, ocorrem vômitos e a febre é baixa ou ausente. Alguns indivíduos apresentam somente diarreia líquida. A doença é autolimitada, com duração de 5 a 10 dias. Aproximadamente 15% das infecções por *E. coli* O157:H7, especialmente em crianças menores de 5 anos e idosos, podem apresentar uma complicação chamada Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), caracterizada por destruição das células vermelhas do sangue e falência renal que pode ser acompanhada de deterioração neurológica e insuficiência renal crônica. Embora a SHU possa ser determinada por outros patógenos, nos Estados Unidos, a maioria dos casos se deve à infecção pela *E. coli* O157:H7 e ela é também a principal causa da falência renal aguda em crianças. Estima-se a ocorrência de 73.000 casos de infecção, 2.100 hospitalizações e 61 casos fatais (letalidade de 3% a 5%), anualmente naquele país. A *Escherichia coli* O157:H7 foi reconhecida, pela primeira vez, como causa de enfermidade nos Estados Unidos em 1982, durante um surto de diarreia sanguinolenta severa, tendo sido isolada em hambúrgueres contaminados. Desde então, a maioria das infecções são provenientes da ingestão de carne moída mal cozida. (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995). Na Argentina, a

Síndrome Hemolítica Urêmica em crianças menores de 5 anos é endêmica. Contudo, no Brasil, não há estudos que estabeleçam uma nítida relação entre a síndrome, a bactéria e os alimentos. (OPAS/OMS, 1999; BARCELOS, 2000)

1.7. Os lipossomas

Lipossomas são estruturas vesiculares e microscópicas da ordem de 0,05 à 5,0 μm , formadas basicamente por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos. (BANGHAM *et al.*, 1964) Eles são formados espontaneamente, quando lipídios anfifílicos são dispersos em água. Os componentes formadores dos lipossomas se agregam formando assim as bicamadas, que se fecham sobre si mesmas, formando estruturas esféricas onde uma ou mais camadas lipídicas englobam parte da solução de fármaco no seu interior. (PRISTA *et al.*, 1981; GREGORIADIS *et al.*, 1993) Eles possuem inúmeras vantagens, entre as quais podemos ressaltar a sua grande especificidade, o que reduz a dose necessária, levando a menos reações de hipersensibilidade, mesmo no caso de administrações sucessivas. Os lipossomas, quando do desenvolvimento de vacinas, funcionam como ótimos vetores. (GREGORIADIS, 1990; UCHIDA, 2003).

1.7.1. Lipossomas em vacinas

A proteção limitada fornecida pela maioria das estratégias de vacinação direcionou as pesquisas para a investigação de vacinas alternativas, focadas no desenvolvimento de adjuvantes efetivos e sistemas de liberação controlada (CUNHA, 2004). Os lipossomas têm sido propostos como veículos de liberação

lenta de antígenos encapsulados (BEN-YEHUDA *et al.*, 2003; MAZUMDAR *et al.*, 2004).

Quando utilizados como adjuvantes, os lipossomas apresentam inúmeras vantagens em relação aos demais adjuvantes tradicionais: (FRÉZARD, 1999)

- ❑ não formam granulomas no sítio da injeção;
- ❑ não geram reações de hipersensibilidade;
- ❑ não estimulam a produção de anticorpos contra o componente fosfolipídico;
- ❑ não geram efeitos colaterais no uso repetido;
- ❑ diminuem a toxicidade ;
- ❑ São biodegradáveis;
- ❑ Podem ser produzidos inteiramente de forma sintética;
- ❑ Apresentam versatilidade uma vez que podem ser usados para transportar antígenos bacterianos, virais, protozoários, tumorais etc;
- ❑ Ajudam a levar à imunização efetiva (macrófagos apresentam antígenos para linfócito T com produção de IgM e IgG).

Ao ser administrado o lipossoma interage com dois grupos de proteínas plasmáticas: HDL e opsoninas, que possibilitam a captura pelos macrófagos, onde são fagocitados e eventualmente acumulados em lisossomas. (FRÉZARD, 1999) Nos lisossomas, os peptídeos degradados são apresentados ao complexo de histocompatibilidade classe II, ligado na superfície dos macrófagos, resultando na estimulação das células T-helper específicas e, finalmente, na estimulação de células B específicas, o que resulta na subsequente secreção de anticorpos (TORCHILIN, 2005).

Uma estratégia para aumentar o efeito da vacina é liberar especificamente o antígeno no órgão alvo. A conjugação de proteínas virais na membrana de lipossomas (virossomas) oferece a oportunidade para explorar o direcionamento e propriedades fusogênicas de membranas de proteínas virais. Esta propriedade dribla o inconveniente da degradação pelos lisossomas antes de alcançarem o

citoplasma, pois os virossomas são usados como o próprio vírus, introduzindo o material dentro do citoplasma (KANEDA, 2000; SINGH e O'HAGAN, 2003)

Outra vantagem dos virossomas é o ganho do tropismo do tecido pela proteína viral. Alguns vírus são direcionados para células ou tecidos específicos: Epstein-Barr vírus (EBV) o qual infecta principalmente linfócitos B, vírus da hepatite B, que ataca os hepatócitos, e HIV direcionados para os linfócitos e macrófagos (KANEDA, 2000).

MINATO *et al.* (2003) realizaram um estudo avaliando o efeito do uso de lipossomas PEG-modificados na administração oral de vacina utilizando ovalbumina como modelo de antígeno. Concluíram que lipossomas peguilados melhoram a imunidade da mucosa, provavelmente devido à liberação controlada de antígenos dos lipossomas para a mucosa local. Por outro lado, os lipossomas estimularam o sistema imune, possivelmente, devido ao aumento do tempo de permanência dos lipossomas PEG-modificados na circulação.

O uso de imunolipossomas usando anticorpos monoclonais ligados ao lipossoma, para carrear tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos, tem recebido muita atenção. Tem sido demonstrado que o específico direcionamento de antígenos e fármacos para células-alvo é bem mais eficiente quando se trabalha com imunolipossomas do que com lipossomas desprovidos de anticorpo (CROWLE *et al.*, 1991; CUNHA *et al.*, 2007) e essa eficiência dependeria da densidade de anticorpos adsorvidos na superfície. (CUNHA *et al.*, 2007).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo avaliaram e compararam as características adjuvantes do toxóide de Stx2 (Toxinas de Shiga produzidas por *Escherichia coli* - STEC), detoxificada por meio de formolaldeído pela via de imunização intramuscular administrados isoladamente ou em conjunto à proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B . O lipossoma é um promissor veículo e protetor de envoltório para a preparação antigênica utilizada. Anticorpos da classe IgG de alta-intermediária avidéz foram produzidos para antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B. O sistema lipossomo assim como as nanocápsulas, nanoesferas, microesferas enfim, todos esses sistemas modernos de transporte precisam ser melhor estudados não apenas pelo nosso grupo de pesquisa mas, por grupos do mundo inteiro, afim de se mostrar seu verdadeiro potencial e contribuição para a sociedade seja como um sistema transportador ou adjuvante . Esses sistemas são mecanismos de liberação modificada, logo, têm inúmero potencial em garantir uma ótima imunização de longa duração, uma vez, que a liberação de antígenos nesses modelos se dá de forma gradual, estimulando continuamente e por longo tempo o sistema imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. G.; K. A. DEEVER, S. L.; COCHI, B. D.; PLIKAYTIS, E. R.; ZELL, C.; V. BROOME, J. D. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. **JAMA**, v. 269, p. 221–226, 1993.

ALMEIDA, M.; FERREIRA, T.; ITO, A. Y.; CUNHA, T. N.; CARMO, A. M. S.; TUNES, C. F.; NERI, S.; SANTOS, M. V.; BOZZOLI, L.; TEIXEIRA, M. L.; FERRAZ, A. S.; DE GASPARI, E. N. Evaluation of 50 Kda protein as a vaccine candidate for group B *Neisseria meningitidis* in a murine nasal challenge model. **Clin. Immunol.**, v. 119, p. 182, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Control of Communicable Diseases Manual**. 16. th ed. BENENSON, A. S. Washington, DC: APHA, 1995.

APICELLA, M. *Neisseria meningitidis*. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; KELVIN, G. V. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. New York: American Academy of Pediatrics, 2005. v. 2, p. 2498–2513.

APICELLA, M. *Neisseria meningitidis*. In: **2000 Red book: Report of the Committee on Infectious Diseases**. 25th ed. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics, 2000. p. 351-359.

ARIGITA, C.; WIM, J.; MATTHISJS, R. G.; GIDEON, F. A. K. Outer Membrane Protein Purification. In: POLLARD, A. J. **Methods in molecular medicine: Meningococcal vaccines**. Methods and protocols. Totowa, N.J.: Maiden @Humana Press, 2001. v. 66, p. 61-79.

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

BARCELOS, A. L. et al. Síndrome hemolítico-urêmica: análise retrospectiva de 25 casos. **J. Bras. Nefrol.** Desenvolvido no Serviço de Nefrologia e Serviço de Pediatria. Hospital Universitário de Santa Maria/UFSM em 2000.

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.

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

BELO, E. F.; COUTINHO, L.M.; FERRAZ, A. S.; DE 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, n. 6, p. 407-418, Dec. 2004. Epub May 2005.

BEN-YEHUDA, A.; JOSEPH, A.; BARENHOLZ, Y.; ZEIRA, E.; EVEN-CHEN, S.; LOURIA-HAYON, I.; BABAI, I.; ZAKAY-RONES, Z.; GREENBAUM, E.; GALPRIN, I.; GLÜCK, R.; ZURBRIGGEN, R.; KEDAR, E. Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. **Vaccine**, v. 21, p. 3169-3178, 2003.

* **De acordo com:**

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

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

BERSTAD, A. K. *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.

BORROW, R.; ANDREWS, N.; GOLDBLATT, D.; MILLER, E. Serological basis for use of meningococcal serogroup C conjugate vaccines in the United Kingdom: reevaluation of correlates of protection. **Infect. Imm.**, v. 69, p. 1568-1573, 2001b.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, 248-254, 1976.

BRICKS, L. F. Doenças meningocócicas - morbidade e epidemiologia nos últimos 20 anos: revisão. **Pediatria (São Paulo)**, v. 24, n.3-4, p. 122-131, 2002.

CARO, J. J.; MÖLLER, J.; GETSIOS, D.; COUDEVILLE, L.; EL-HADI, W.; CHEVAT C.; NGUYEN, V. H.; CARO, I. Invasive meningococcal disease epidemiology and control measures: a framework for evaluation, **BMC Public Health.**, v.29, n.7, p. 130, 2007.

CAUGANT, D. A.; E. A. HOIBY, P.; MAGNUS, O.; SCHEEL, T.; HOEL, G.; BJUNE, E.; WEDEGE, J. E. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, p.323-330, 1994.

CEESAY, S. J.; ALLEN, S. J.; MENON, A.; TODD, J. E., CHAM, K.; CARLONE, G. M.; TURNER, S. H.; GHEESLING, L. L.; DEWITT, W.; PLIKAYTIS, B. D. Decline in meningococcal antibody levels in African children 5 years after vaccination and the lack of an effect of booster immunization. **J. Infect. Dis.** v. 167, n. 5, p. 1212-1216, may. 1993.

COUTINHO, L. M. C. C. **Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacarídeos (LPS) da cepa epidêmica B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis* : imunização nasal.** 135 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CUNHA, T. N. **Preparação e avaliação de sistemas lipossomais para transporte da rifampicina.** 120 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CUNHA, T. N.; SOARES, I. C.; DE GASPARI, E. N. Em busca de lipossomas inteligentes para a administração de drogas para a tuberculose. **BEPA**, v. 4, n. 39, mar. 2007.

DE GASPARI, E. N. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacteria genera. **Hybridoma (New York)** (Cessou em 2001. Cont. 1554-0014 Hybridoma [Larchmont]), v. 19, n. 6, p. 445-453, 2000.

DE GASPARI, E. N. ; ZOLLINGER, W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients and evaluation of two new monoclonal antibodies. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 143-153, 2001.

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 São Paulo, Brazil. **Lancet**, v. 340, n. 1074-1078, 1992.

DEVI, S. J.; SCHNEERSON, R. W.; VANN, W. F.; ROBBINS, J.B.; SHILOACH, J. Identity between polysaccharide antigens of *Moraxella nonliquefaciens*, Group B *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* K1 (non-o-acetylated). **Infect. Immun.**, v.59, n.2, p.732-736, 1991.

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

ELSON, C. O.; DERTZBAUGH, 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.

FEIL, E. J.; ENRIGHT, M. C.; SPRATT, B. G. Estimating the relative contributions of mutation and recombination to clonal diversification: a comparison between *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 465-469, 2000.

FEIL, E. J.; MAIDEN, M. C.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, p. 1496-1502, 1999.

FERRAZ, A. S.; BELO, E. F.; COUTINHO, L. M.; OLIVEIRA, P.; CARMO, A. M.; FRANCO, D. L.; FERREIRA, T.; YTO, A. Y.; MACHADO, M. S.; SCOLA, M.C.; DE GASPARI, E. Storage and stability of IgG and IgM monoclonal antibodies dried on filter paper and utility in *Neisseria meningitidis* serotyping by Dot-blot ELISA. **BMC Infect. Dis.**, v. 8, n. 30, p. 30-38, 2008.

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

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 2, p. 136-169, 1997.

FLETCHER, L. D.; BERNFIELD, L.; BARNIAK, V.; FARLEY, J. E.; HOWELL, A.; KNAUF, M.; SMITH, R. P.; WEISE, P.; WETHERELL, M.; XIE, X; ZAGURSKY, R; ZHANG, Y; ZLOTNICK, G. W. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2088-2100, apr. 2004.

FRASCH, C. E. Vaccines for prevention of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2 Suppl:S, p. 134-138, apr. 1989.

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

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

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.

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. 1, n. 129, p. 1367-1384, jun.1969.

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.

GREGORIADIS, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. **Immunol. Today**, v. 11, n. 3, p. 89-97, mar. 1990.

GREGORIADIS, G.; FLORENCE, A. T. Liposomes in drug delivery: clinical, diagnostic and ophthalmic potential., **Drugs**, v. 45, p. 15-28, 1993.

GREENFIELD, S.; SHEEHE, P. R.; FELDMAN, H. A. Meningococcal carriage in a population of "normal" families. **J. Infect. Dis.**, v. 123, p. 67-73, 1971.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, Other Enterhemorrhagic *E. coli*, and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Epidemiol. Rev.**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GRIFFISS JM; YAMASAKI R; ESTABROOK M; KIM JJ. Meningococcal molecular mimicry and the search for an ideal vaccine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, Suppl. 1, 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.

HARRISON, L.H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 142-164, 2006.

HAUGAN A; THI DAO PX; GLENDE N; BAKKE H; HAUGEN IL; 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.

ITO, A. Y. Homologous prime-boost strategy in neonate mice using *Neisseria lactamica*. **Vaccine**, v.1, p.114, 2009.

JODAR, L.; FEAVERS, I. M.; SALISBURY, D.; GRANOFF, D. M. Development of vaccines against meningococcal disease. **The Lancet**, v. 359, n. 9316, p.1499-1508, 2002.

JOLLEY, K. A.; WILSON, D. J.; KRIZ, P.; MCVEAN, G.; MAIDEN, M. C. The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, p. 562-569, 2005.

KANEDA, Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 43, p. 197-205, 2000.

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.

KLEIJN, E. D.; GROOT, R.; LABADIE, J.; LAFEVER, A. B.; VAN DEN DOBBELSTEEN; VAN ALPHEN, L. Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer-membrane-vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. **Vaccine**, v. 18, p. 1456-1466, 2000.

KLEIJN, E. D.; GROOT, R.; LAFEVER, A. B.; LABADIE, J.; VAN LIMPT, K. C. J. P.; VISSER, J. Immunogenicity and safety of monovalent P1.7,4 meningococcal outer membrane vesicle vaccine in toddlers: comparison of two vaccination schedules and two vaccine formulations. **Vaccine**, v. 19, p. 1141-1148, 2001.

HARRISON, L. H. Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 142-164, jan. 2006.

LEPOW, M. L.; PERKINS, B. A.; HUGHES, P. A.; POOLMAN, J. T. Meningococcal vaccines. In: PLOTKIN, A. S.; ORENSTEIN, W. A. (Ed.) *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 711-27.

MARTIN, D.; CADIEUX, N.; HAMEL, J.; BRODEUR, B. R. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. **J. Exp. Med.**, v. 7, n. 185, p. 1173-1183, apr. 1997.

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

MILAGRES, L. G.; BRANDILEONE, M. C. C.; SACCHI, C. T.; VIEIRA, V.S.D.; ZANELLA, R. C.; FRASCH, C. E. Antibody studies in mice of outer membrane antigens for use in an improved meningococcal B and C vaccine. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 13, p. 9-17, 1996.

MINATO, S.; IWANAGA, K.; KAKEMI, M.; YAMASHITA, S.; OKU, N. Application of polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes for oral vaccines: effect of lipid dose on systemic and mucosal immunity. **J. Control. Rel.**, v. 89, p. 189-197, 2003.

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

MOREIRA, J. **Roteiro de Aula Prática n. 6.** Bioquímica I : Proteínas. Disponível em: <[http://www.fag.edu.br/professores/cristina/Agronomia - Pr%E1tica Bioqu%C3%ADmica/roteiro_pr%E1tica_Eletr%C3%B3forese_de_prote%C3%ADnas_Gel_acril%C3%A2mida-AULA_06.doc](http://www.fag.edu.br/professores/cristina/Agronomia_-_Pr%E1tica_Bioqu%C3%ADmica/roteiro_pr%E1tica_Eletr%C3%B3forese_de_prote%C3%ADnas_Gel_acril%C3%A2mida-AULA_06.doc)>. Acesso em: 20 set. 2008.

MORETTI, P. E. **Microbiologia: Fundamentos & Aplicações - Bacteriologia - Estrutura Celular - 2007** Disponível em: <http://www.fam.br/microrganismos/bacteriologia_envelope.htm#Bact%C3%A9rias%20Gram-negativas>. Acesso em: 18 jun. 2008.

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

NEUBERGER, M. S.; EHRENSTEIN, M. R.; RADA, C.; SALE, J.; BATISTA, F.D.; WILLIAMS, G. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.**, v. 355, p. 357-60, 2000.

OHMURA-HOSHINO, M.; YAMAMOTO, M.; YUKI, Y.; TAKEDA, Y.; KIYONO, H. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. **Vaccine**, v. 22, p. 3751-3761, 2004.

OGRA, P. L. Mucosal immunoprophylaxis: an introductory overview. In: KIYONE, H.; OGRA, P. L.; MC GHEE, J. M. (Ed.). **Mucosal vaccines**. San Diego, California: Academic Press, 1996. p. 3-13.

OPAS/OMS - Vigilância del Síndrome Urémico Hemolítico. Documento técnico referente ao protocolo firmado entre países do Mercosul (OPAS/OMS, CDC/Atlanta e INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran"/Ar), 1999.

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

PELTOLA, H. Meningococcal vaccines: current status and future possibilities. **Drugs**, v.55, n.3, 1998.

POLLARD, A. J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 8, n. 19 (11-12), p. 1327-1346, jan. 2001.

PIERRI, E.G.; GREMIÃO, M.P.D. Métodos de preparação de lipossomas. **Infarma**, v. 11, n. 9 -10, p.60-66, 1999.

PICHICHERO, M. E. The new meningococcal conjugate vaccine: a profile of its safety, efficacy, and indications for use. **Postgrad. Med.**, v. 119, n. 1, p. 47-54, 2006.

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

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

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. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RAFF, H. V.; DEVEREUX, D.; SHERFORD, W.; ABBOTT-BROWN, D.; MALONEY, G. Human monoclonal antibody with protective activity for *Escherichia coli* k1 and *Neisseria meningitidis* group B infection. **J. Infect. Dis.**, v. 157, n. 1, 1988.

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.

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

SERAFIM, M. S. **Estudo da imunogenicidade de antígenos de *Neisseria lactamica***: utilização de anticorpos monoclonais. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 469-478, 2003.

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.

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.

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.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev. Drug Disc.**, v. 4, p. 145-160, 2005.

Tunes, C. F.; Ferraz, A. S.; Scola; Mônica, C. G.; De Gaspari, E. N. Intranasal delivery of whole cells of *Neisseria* species: study of cross - reactive antigens in rabbits. **The Open Vaccine Journal**, v. 1, p. 13-21, 2008.

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

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

VAN DEN BERG, B. M.; BEEKHUIZEN, H.; MOOI, F. R.; VAN FURTH, R. Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 1050-1055, 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.

VEEKEN, H.; RITMEIJER, K.; HAUSMAN, B. Priority during a meningitis epidemic: vaccination or treatment? **Bull. World Health. Organ.**, v. 76, n. 2, p. 135-41, 1998.

VERHEUL, A. F. M.; SNIPPE, H.; POOLMAN, J. T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. **Microbiol Rev.**, v. 57, p. 44-49, 1993.

WHO - World Health Organization. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. **World Health Organization Technical Report Series**, no.594. Geneva, 1976.

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.

ZAIA,D.A.M.;ZAIA,C.T.B.V.;LICHTIG,J.Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**, v. 21, n. 6, Nov./Dec. 1998.

ZOLLINGER WD, MORAN EE, DEVI SJ, FRASCH CE. Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 3, p. 1053-1060, mar. 1997.