GIOVANNA FERREIRA COSTA LEÃO SALUSTIANO

**Comparação entre
Neisseria meningitidis e *Neisseria lactamica*:
Cinética do cultivo e potencial antigênico
de OMV e frações**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2015

GIOVANNA FERREIRA COSTA LEÃO SALUSTIANO

**Comparação entre
Neisseria meningitidis e *Neisseria lactamica*:
cinética do cultivo e potencial antigênico
de OMV e frações**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Rocilda Perazzini Furtado Schenkman

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

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

© reprodução total

Salustiano, Giovanna Ferreira Costa Leão.

Comparação entre *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*:
cinética do cultivo e potencial antigênico de OMV e frações / Giovanna
Ferreira Costa Leão Salustiano. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Rocilda Perrazzini Furtado Schenkman.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração:
Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de vacinas.

Versão do título para o inglês: Comparison between *Neisseria*
meningitidis and *Neisseria lactamica*: kinetics of bacterial growth and
analysis of the antigenic potential of OMV and fractions.

1. *Neisseria lactamica* 2. *Neisseria meningitidis* 3. Outer membrane
vesicles 4. Reatividade cruzada 5. Vacina I. Schenkman, Profa.
Dra. Rocilda Perrazzini Furtado II. Universidade de São Paulo. Instituto
de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB020/2015

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

Candidato(a): Giovanna Ferreira Costa Leão Salustiano.

Título da Tese: Comparação entre *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*: cinética do cultivo e potencial antigênico de OMV e frações.

Orientador(a): Profa. Dra. Rocilda Perrazzini Furtado Schenkman.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, protocolo no 802/11

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento da vacina de meningite meningocócica com vesículas de membrana externa (OMV) de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*: um estudo comparativo" **protocolo nº 802/11**, sob a responsabilidade de Rocilda P. F. Schenkman, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/05/2011.

We certify that the research entitled "Development of meningococcal vaccine from outer membrane vesicles (OMV) of *Neisseria meningitides* and *Neisseria lactamica*", **protocol nº 802/11**, under the responsibility of Rocilda P. F. Schenkman, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 05/12/2011.

Vigência do Projeto: 05/2011 – 03/2014	Nº de animais/espécie
Centro de Biotecnologia	300 camundongos Swiss Fêmeas

São Paulo, 13 de maio de 2011.

(Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ailed, pelo exemplo de vida e coragem e pelo apoio e compreensão demonstrados, durante o curso, e principalmente no processo de construção deste trabalho.

À minha Orientadora Rocilda Perazzini Furtado Schenkman pela dedicação, empenho, compreensão, competência e profissionalismo. Agradeço a amizade, por sempre acreditar e confiar no meu trabalho, pelos ensinamentos desde a época da iniciação científica que me fizeram crescer como profissional e como pessoa.

À Beatriz e a Mariana, minhas companheiras de laboratório, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões tão importantes para o desenvolvimento do trabalho, e principalmente pelas conversas e companhia nos longos dias de cultivo.

Aos meus amigos de trabalho: Stefanie, Douglas, Rafaela, Paola, Felipe, Camila, Mariana pelos momentos de descontração, pelas conversas nos almoços nas festinhas e pelas muitas risadas; pela troca de ideias, pelo carinho e apoio constantes. A minha amiga Daniela, pelas conversas de incentivo e pela ajuda nos momentos de desespero, pela compreensão e pela troca de informações ao longo de todos esses anos de amizade.

A todos os amigos que fiz ao longo do curso, em especial na disciplina de imunologia, obrigada pela risada e momentos de descontração tão necessários nessa rotina de laboratório e estudos. A todos os amigos do Butantan e da vida, obrigada pelo carinho apoio, interesse e incentivo.

Ao Diogo pelo amor, pelo carinho e pelo companheirismo. Agradeço por você sempre me ouvir e me acalmar nos momentos de desespero e me incentivar a persistir e conquistar os inúmeros desafios encontrados ao longo deste importante processo da minha vida.

Ao Instituto Butantan por me receber como estagiária e por contribuir na minha formação profissional.

À Dra. Mickie do laboratório de Bioprocessos I pela colaboração e ajuda nas fermentações e nas análises das amostras no HPLC.

À equipe do Laboratório de Bioprocessos I do Instituto Butantan, ao Sr. Lourivaldo, ao Sr. Máximo, ao Sr. Hélio e a Sra. Ana pela contribuição na execução deste trabalho com o preparo do material utilizado durante todos os ensaios. Obrigada por fazer o melhor trabalho possível mesmo com os prazos apertados.

À Dra. Júlia P. C. da Cunha, Pesquisadora Científica do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada projeto CAT-cepid, do Instituto Butantan pelas análises de espectrometria de massas e pela colaboração na interpretação dos dados.

Ao Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman e a aluna Enyd Crystina R.O. Bentivoglio do Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas da Universidade de São Paulo pelas análises do potencial Zeta, tamanho e polidispersão.

À Dra. Sylvia M. Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan pela realização da microscopia eletrônica

A todos os docentes das diferentes disciplinas cursadas ao longo do curso de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

A toda minha família pelo carinho e união.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desta tese.

Muito Obrigada!

RESUMO

SALUSTIANO, G. F. C. L. **Comparação entre *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*: cinética do cultivo e potencial antigênico de OMV e frações.** 2015. 177 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neisseria meningitidis é o agente causador da doença meningocócica, responsável por 500 mil casos da doença por ano, em todo o mundo. Evidências epidemiológicas e imunológicas sugerem que a presença de *N. lactamica*, um dos primeiros organismos a colonizar a orofaringe de recém-nascidos, contribui para o desenvolvimento de imunidade natural contra a doença meningocócica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é comparar *N. meningitidis* e *N. lactamica* quanto à cinética de cultivo e produtividade das vesículas de membrana externa, OMVs, e analisar a composição proteica, potencial antigênico das OMVs e reatividade cruzada, como abordagem alternativa para a produção de vacinas contra a doença meningocócica. Foram realizados cultivos de ambas as espécies em biorreatores de 5L, a 36°C, pressão de 0,2 bar, vazão de ar superficial de 1L/min, agitação entre 250-850rpm por 12 horas, em meio de Catlin modificado para as concentrações de lactato e aminoácidos. OMVs foram purificadas do sobrenadante do cultivo por centrifugação, seguida por ultracentrifugação. Camundongos foram imunizados com 3 doses subcutâneas de OMV de *N. meningitidis* e com OMV e componetes protéicos selecionados de *N. lactamica*. A reatividade dos soros foi avaliada por imunoblote e ELISA. Amostras das proteínas selecionadas e OMVs inteiras foram analisadas em espectrômetro de massa e foram identificadas 229 proteínas em OMV de *N. lactamica*, com 77 previstas como proteínas de membrana e 243 em OMV de *N. meningitidis* com 54 previstas como proteínas de membrana. Vesículas de membrana externa também foram submetidas a análises de tamanho das partículas, polidispersabilidade e potencial zeta. A OMV de *N. lactamica* apresentou carga neutra de 0 mV e 110,7 nm de diâmetro e a OMV de *N. meningitidis* carga negativa de -30,80 mV e 141,4 nm. A produtividade de OMV de *N. lactamica* foi 0,32 g/L.h, cerca de 2,5 vezes maior do que a produtividade de *N. meningitidis* que foi de 0,13g/L.h. A concentração máxima de OMV de *N. lactamica* foi 152 mg/L, 5 vezes maior do que o obtido para *N. meningitidis* que foi de 30mg/L. Com base nos dados de imunoblotting e proteômica foram identificadas oito proteínas-alvo envolvidas na reatividade cruzada: App, Omp85, PilQ, TbpB, PorB, PorA, ComI e Opa/Opc. A identificação destes antígenos pode permitir o desenvolvimento de vacinas de OMVs de *Neisseria* para a doença meningocócica.

Palavras-chaves: *Neisseria lactamica*. *Neisseria meningitidis*. Outer membrane vesicles. Reatividade cruzada. Vacina.

ABSTRACT

SALUSTIANO, G. F. C. L. **Comparison between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*: kinetics of bacterial growth and analysis of the antigenic potential of OMV and fractions.** 2015. 177 p. PH. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neisseria meningitidis is the causative agent of meningococcal disease, accounting for 500 thousand cases per year all over the world. Immunological and epidemiological evidences suggest that the presence of *N. lactamica*, one of the first organisms to colonize the oropharynx of neonates, contributes to development of natural immunity in young children against meningococcal disease. The present work compared the kinetics of bacterial growth and OMV production of *N. meningitidis* and *N. lactamica*. An immuno-proteomic methodology was used to assess the protein composition and antigenic potential of OMV as an alternative approach to vaccine production against meningococcal disease. Bacteria were cultured in 5L bioreactors, 36°C, 0.2 bar, overlay air 1 L/min, agitation 250-280 rpm for a period of 12 hours in a modified Catlin medium for lactate and amino acids concentrations. OMV were purified from culture supernatant by centrifugation followed by ultracentrifugation. Swiss mice, distributed in 5 groups and control, were immunized with 3 subcutaneous doses of selected *N. lactamica* proteins, OMV (2 µg in 100µL) from *N. meningitidis* or *N. lactamica*. The cross-reactivity of murine sera against OMV proteins from *N. meningitidis* and/or *N. lactamica* was evaluated by immunoblotting and ELISA. OMV samples and selected proteins were analyzed on mass spectrometer. The software identified 229 proteins in *N. lactamica* OMV, with 77 predicted as membrane proteins and 243 in *N. meningitidis* OMV with 54 predicted as membrane proteins. Particle size, polydispersity, and zeta potential of OMV were also determined. *N. meningitidis* OMV were negatively charged exhibiting a zeta potential of -30.80 mV and diameter of 141.5nm. *N. lactamica* OMV were neutral exhibiting a zeta potential of 0.0 mV, and diameter of 110.35nm. These features of charge and size could imply an advantage in vaccine design due to reduction of non-specific interaction with any cell type in vivo. The maximum OMV concentration value attained was 152 mg/L with correspondent productivity of 0.32 g/(L.h) in a modified Catlin media with yeast extract for *N. lactamica*. *N. meningitidis* cultured in this same media obtained maximum OMV concentration values about 5 times lower and a productivity about 2.5 times lower of 30mg/L and 0.13 g/(L.h) respectively. The experiments performed identify antigenic target from *N. meningitidis* and *N. lactamica*. The immunoblotting and proteomic data showed 8 target proteins involved in cross-reactivity: App, Omp85, PilQ, TbpB, PorB, PorA, ComI e Opa/Opc. Identification of these antigens could allow the development of protective meningococcal vaccines using *Neisseria* OMV.

Keywords: *Neisseria lactamica*. *Neisseria meningitidis*. Outer membrane vesicles. Cross-reactivity. Vaccine.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Representação das estruturas de membrana de <i>Neisseria meningitidis</i> envolvidas na tipificação.	24
Figura 2 – Imagem representativa da liberação das vesículas de membrana externa de <i>N. meningitidis</i>	32
Figura 3 – Fluxograma das etapas do processo de cultivo e purificação das OMV .	40
Figura 4 – Fluxograma das etapas de obtenção das vacinas.	41
Figura 5 – SDS-PAGE das OMVs de <i>N. lactamica</i> do cultivo em biorreator. As bandas indicadas como 7, 8 e o conjunto de bandas indicado como 9 foram isoladas para utilização no ensaio de imunização.....	51
Figura 6 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV obtidas na 12ª hora do cultivo do ensaio 6 com <i>Neisseria lactamica</i> e do ensaio 2 com <i>Neisseria meningitidis</i>	57
Figura 7 - Curvas de biomassa, concentração de OMV, concentração de lactato e ácidos orgânicos, em biorreator. Grupo A - <i>Neisseria meningitidis</i> em MC2LAA.....	64
Figura 8 - Dados obtidos em tempo real de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e agitação. Grupo A – <i>Neisseria meningitidis</i> em MC2LAA.	65
Figura 9 - Curvas de biomassa, concentração de OMV, concentração de lactato e ácidos orgânicos, em biorreator. Grupo B - <i>Neisseria meningitidis</i> em MC2LAA-YE.	69
Figura 10 - Dados obtidos em tempo real de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e agitação. Grupo B – <i>Neisseria meningitidis</i> em MC2LAA-YE.....	69
Figura 11 – Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa	71

Figura 12 – Esquema da utilização de lactato por <i>N. meningitidis</i> para produção de energia e síntese de precursores dos constituintes da célula. Se a glicose está presente a gliconeogênese a partir do lactato fica inativada.	73
Figura 13 - Curvas de biomassa, concentração de OMV, concentração de lactato, ácidos orgânicos, em biorreator. Grupo C - <i>Neisseria lactamica</i> em MC2LAA-YE...	75
Figura 14 - Dados obtidos em tempo real de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e agitação. Grupo C - <i>Neisseria lactamica</i> em MC2LAA-YE.	75
Figura 15 – Microscopia eletrônica de <i>Neisseria meningitidis</i> (A, B), e de suas OMV (C), de <i>Neisseria lactamica</i> (D, E), e de suas OMV (F).	82
Figura 16 – Distribuição de tamanho (diâmetro) das vesículas de <i>Neisseria lactamica</i>	83
Figura 17 – Distribuição de tamanho (diâmetro) das vesículas de <i>Neisseria meningitidis</i>	84
Figura 18 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV de <i>Neisseria meningitidis</i> . Amostras coletadas na 3 ^a , 5 ^a , 7 ^a , 9 ^a , e 12 ^a horas de cultivo. Grupo A	85
Figura 19 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV de <i>Neisseria meningitidis</i> . Amostras coletadas na, 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 11 ^a , e 12 ^a horas de cultivo. GrupoB . A seta sinaliza a presença das IRP na 12 ^a hora.	85
Figura 20 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV de <i>Neisseria lactamica</i> . Amostras coletadas na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a , e 12 ^a horas de cultivo. Grupo C . A seta sinaliza a proteína que se torna mais intensa ao longo do cultivo.	86
Figura 21 - Imunoblote. A: OMV de <i>N. lactamica</i> imobilizada em membrana de nitrocelulose. Reatividade dos soros anti-proteína 7, P7 (linha 1), anti-proteína 8, P8 (linha 2), anti-conjunto proteico 9, P9 (linha 3) e anti-OMV de <i>N. lactamica</i> (linha 4). B: OMV de <i>N. meningitidis</i> imobilizada em membrana de nitrocelulose grupo A, e reatividade dos soros anti-OMV de <i>N. lactamica</i> . C: Gel SDS-PAGE 12,5 % de OMV de <i>N. lactamica</i>	89

Figura 22 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos contra OMV de *N. meningitidis* em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O gráfico ilustra o resultado do pool de soros de cada grupo do ensaio II....92

Figura 23 - Imunoblote. **A:** OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose. Reatividade do soro anti-proteína 7, P7 (linha 1), reatividade do soro anti-proteína 8, P8 (linha 2), reatividade do soro anti-complexo protéico 9, P9 (linha 3), reatividade do soro anti-OMV de *N. lactamica* (linha 4). **B:** OMV de *N. meningitidis* (cultivo do grupo A) imobilizada na membrana de nitrocelulose e reatividade do soro anti-OMV de *N. meningitidis* cultivada em MC2LAA (grupo A), e reatividade do soro anti-OMV de *N. meningitidis* cultivada em MC2LAA-YE (grupo B). **C:** OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose e reatividade dos soros anti-OMV de *N. meningitidis* (linha 1). OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose e reatividade dos soros anti-OMV de *N. lactamica* (linha 2). OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose, e reatividade dos soros anti-OMV de *N. lactamica* (linha 3). **D:** OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose e reatividade dos soros anti-proteína 7, P7 (linha 1), anti-proteína 8, P8 (linha 2) e anti-complexo protéico 9, P9 (linha 2) de *Neisseria lactamica*.94

Figura 24 – Estrutura tridimensional determinada por cristalografia da proteína 4AR0 ou PilQ de *Neisseria meningitidis*.1- **dodecamero** ; 2- monômero103

Figura 25 – Estrutura tridimensional determinada por cristalografia da proteína 3VY9 ou PorB de *Neisseria meningitidis* complexada com íon cério.1-trímero; 2-monômero106

Índice de tabelas

Tabela 1 – Casos confirmados de meningite por <i>Neisseria meningitidis</i> e número de óbitos, no Brasil, no período de 2002 a 2013.....	28
Tabela 2 - Casos confirmados notificados de meningite meningocócica por etiologia e sorogrupo no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.	29
Tabela 3 - Resumo dos estudos com vacinas de vesículas de membrana externa contra <i>N. meningitidis</i>	34
Tabela 4 – Ensaio realizados e condições de cultivo.....	44
Tabela 5 – Etapas do processo e condições de cultivo	45
Tabela 6 - Concentrações utilizadas em cada formulação vacinal nos diferentes ensaios.....	52
Tabela 7 – Diluições dos soros utilizadas nos imunoblotes	55
Tabela 8 - Resultados experimentais do Grupo A - <i>Neisseria meningitidis</i> em MC2LAA. Destaque em cinza para os valores máximos de DO _{540nm} e OMV.....	64
Tabela 9 – Resultados experimentais do Grupo B . <i>Neisseria meningitidis</i> em MC2LAA-YE Destaque em cinza para os valores máximos de DO _{540nm} e OMV.....	68
Tabela 10 – Resultados experimentais do Grupo C . <i>Neisseria lactamica</i> em MC2LAA-YE Destaque em cinza para os valores máximos de DO _{540nm} e OMV.....	74
Tabela 11 – Comparação das médias dos valores máximos de biomassa em DO _{450nm} e de concentração de OMV nos ensaio em biorreator de <i>N. meningitidis</i> e <i>N. lactamica</i>	78
Tabela 12 – Valores de concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$); concentração de OMV máxima ($P_{m\acute{a}x}$); fatores de conversão OMV/lactato ($Y_{p/s}$); OMV/biomassa ($Y_{p/x}$);	

biomassa/lactato ($Y_{x/s}$); produtividade em biomassa (Prod X); produtividade em OMV (Prod P). Destaque para os valores máximos de cada parâmetro.80

Tabela 13 – Potencial zeta, polidispersão e diâmetro médio das OMV de *N. meningitidis* e *N. lactamica*.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 14– Esquematização da reatividade dos soros contra proteína 7, proteína 8, proteína 9 e OMV de *N. lactamica* contra a OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose.96

Tabela 15– Esquematização da reatividade dos soros contra OMV de *N. meningitidis* grupo A, OMV de *N. meningitidis* grupo B, proteína 7, proteína 8, proteína 9 e OMV de *N. lactamica* contra a OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose97

Tabela 16 – Proteínas de *Neisseria lactamica* e *N. meningitidis* identificadas por meio dos imunoblotes e espectrometria de massa nos diferentes ensaios realizados.98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFPL 1 – Aduvante Fynlay proteolipossomo 1

AMH – Ágar Müller- Hinton

App – Proteína de adesão e penetração

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – “Bovine serum albumin”

CAT – Centro de Toxinologia Aplicada

ComL – Lipoproteína de competência

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DDA – Aquisição dependente de dados

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

DO_{540nm} – Densidade óptica com comprimento de onda de 540 nm

DTT – Ditioneitol

ED – Via Entner–Doudoroff

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMV – Via Embden-Meyerhof-Parnas

FAD – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo

fHbp – Proteína que se liga à heparina

GI – Gene index

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IAA – Iodoacetamida

IgG – Imunoglobulina G

IRP – proteínas reguladas pelo ferro

Kegg – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LOS – lipooligossacarídeo

LPS – lipopolissacarídeo

LTQ-XL – Linear íon trap

MC – Meio de Catlin

MC2LAA – Meio de Catlin com a concentração de aminoácidos e lactato dobradas.

MC2LAA-YE – Meio de Catlin com a concentração de aminoácidos e lactato dobradas com 2 gramas por litro de extrato de levedura ultrafiltrado

MC-YE – Meio de Catlin com 1 grama por litro de extrato de levedura ultrafiltrado.

MLST – Tipificação por sequência de multilocus

MS – Ministério da Saúde

MV – Membrane vesicles

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NadA – Neisseria adesina A

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NhhA – Proteína hia de neisseria

NNLS – Non-negatively constrained least squares

Omp85 – Proteína de membrana externa 85

OMV – Vesícula de membrana externa

Opa/Opc – Proteínas de opacidade

OPD – Ortofenilenodiamina

PAMP – Padrão molecular patógeno-associado

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T – Solução salina tamponada com fosfato com tween

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PilQ – Proteína do pilus tipo IV

PorA – Proteína porina A

PorB – Proteína porina B

PP – Via das pentoses

rpm – Rotação por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SINAN – Sistema Nacional de Agravos Notificáveis

ST – Sequence type

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

Tbp – Proteína ligadora de transferrina

TBS – Tampão fosfato-salino

TCA – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

TIF – Tagged Image File Format

TPP – Trans Proteomic Pipeline

WHO – Organização Mundial da Saúde

YE – Extrato de levedura ultrafiltrado

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

bar – Unidade de pressão correspondente a aproximadamente 1 atm

ϵ – Constante dielétrica média

g – Grama

h – Hora

kDa – Quilodalton

kV - Quilovolts

L – Litro

M – Molar

mA – Miliampére

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nL – Nanolitros

nm – Nanômetros

P_i - Concentração de produto inicial (mg/L)

$P_{m\acute{a}x}$ - concentração máxima de produto (mg/L)

S_i - Concentração de substrato inicial (g/L)

$S_{p\acute{m}a\acute{x}}$ - Concentração de substrato quando a concentração do produto é máxima

$S_{xm\acute{a}x}$ - Concentração de substrato quando a concentração celular é máxima (g/L)

t_{fp} – Tempo de cultivo correspondente a $P_{m\acute{a}x}$ (h)

t_{fx} – Tempo de cultivo correspondente a $X_{m\acute{a}x}$ (h)

t_i – Tempo inicial

UV – Ultravioleta

V - Volts

v - Volume

X - Concentração celular (g/L);

X_i - Concentração celular inicial (g/L)

$X_{m\acute{a}x}$ - Concentração máxima celular (g/L)

$Y_{P/S}$ - Fator de conversão substrato/produto (g produto/g substrato)

$Y_{P/X}$ - Fator de conversão célula/produto (g produto/g biomassa)

$Y_{X/S}$ - Fator de conversão substrato/célula (g biomassa/g substrato)

ζ - Potencias zeta

η - Viscosidade média

μg - Micrograma

μL - Microlitro

μ_x - Velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1});

$\mu_{xm\acute{a}x}$ - Velocidade específica de geração de biomassa (h^{-1})

Sumário

1 REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	22
1.1.1 <u>Metabolismo</u>	25
1.1.2 <u>Doença meningocócica</u>	26
1.1.3 <u>Vacinas</u>	29
1.2 <i>Neisseria lactamica</i>	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos gerais	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Microrganismos	41
3.2 Lote semente e lote trabalho	41
3.3 Cultivos	42
3.4 Coeficiente de concentração celular entre Massa seca e DO_{540nm}	45
3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos	46
3.6 Purificação das OMVs	47
3.7 Análise do sobrenadante ultracentrifugado das amostras dos cultivos em biorreator	48
3.8 Determinação da concentração de OMV	49
3.9 Perfil eletroforético e Densitometria	49
3.10 Preparação dos antígenos	50
3.10.1 <u>Vacinas de OMV</u>	50
3.10.2 <u>Vacinas de Componentes protéicos de OMV de <i>N. lactamica</i></u>	51
3.11 Imunizações	52
3.11.1 <u>Ensaio vacinal I</u>	53
3.11.2 <u>Ensaio vacinal II</u>	53

3.12 Obtenção do soro	54
3.13 Imunoblote.....	54
3.14 ELISA	55
3.15 Espectrometria de massas.....	57
3.15.1 <u>Digestão 'In gel'</u>	58
3.15.2 <u>Digestão tripsínica em solução.....</u>	59
3.15.3 <u>Espectrometria de massas em LTQ-XL.....</u>	60
3.16 Microscopia eletrônica	61
3.17 Determinação do potencial Zeta, tamanho e polidispersão.....	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Cultivos.....	63
4.1.1 <u>Grupo A</u>	64
4.1.2 <u>Grupo B</u>	67
4.1.3 <u>Grupo C.....</u>	74
4.1.4 <u>Discussão geral dos cultivos</u>	77
4.2 Parâmetros cinéticos.....	79
4.3 Microscopia Eletrônica.....	81
4.4 Determinação do potencial Zeta, tamanho e polidispersão.....	82
4.5 Perfil eletroforético	84
4.6 Espectrometria de massas.....	87
4.7 Análise do potencial antigênico das OMVs e proteínas isoladas de <i>N. meningitidis</i> e <i>N. lactamica</i>	89
4.7.1 <u>Ensaio vacinal I.....</u>	89
4.7.2 <u>Ensaio vacinal II.....</u>	91
4.7.2.1 Elisa	91
4.7.2.2 Imunoblote	93
4.7.3 <u>Dados da literatura sobre as proteínas de interesse</u>	99

4.7.3.1 App – Proteína de adesão e penetração.....	99
4.7.3.2 TbpA e TbpB – Proteína de ligação à tranferrina	100
4.7.3.3 Opm85 – Proteína de membrana externa 85	101
4.7.3.4 PilQ – secretina do pilus tipo IV	102
4.7.3.5 Porinas	103
4.7.3.6 PorA – PorinaA	104
4.7.3.7. PorB – PorinaB	106
4.7.3. 8 ComL – Proteína de lipocompetência.....	108
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
6 CONCLUSÃO	1103
REFERENCIAS*	114
ANEXOS	123

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis é um diplococo gram-negativo, aeróbico, pertencente à família Neisseriaceae. É o agente etiológico da doença meningocócica, conhecido popularmente como meningococo (SAFADI, BEREZIN E OSELKA, 2012).

A bactéria responsável pela doença meningocócica foi identificada e descrita pela primeira vez em 1884 por Marchiafava e Celli, na Itália. Em 1887, o médico austríaco Anton Weichselbaum descreveu a ocorrência de bactérias em forma de diplococos gram-negativos no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, abril/2010).

No Brasil, em 1906, Godinho descreveu pela primeira vez a meningite meningocócica epidêmica a partir de casos clínicos registrados entre imigrantes. O material coletado foi enviado ao Instituto Bacteriológico de São Paulo, atual Instituto Adolfo Lutz, onde identificaram por microscopia o meningococo (REQUEJO, 2005).

A Família *Neisseriaceae* engloba entre outros, o gênero *Neisseria* que compreende as espécies *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *N. lactamica* além de outros diplococos gram-negativos sem relação com doenças invasivas (REQUEJO, 2005)

Segundo Requejo (2005) esses organismos crescem em meios de cultura contendo base de ágar-sangue, ágar-tiptose-soja, ágar-chocolate, ou ágar-Müller-Hinton. Em meio sólido, as colônias são convexas, transparentes ou esbranquiçadas, não pigmentadas e não hemolíticas.

N. meningitidis, como toda bactéria gram-negativa, possui lipopolissacarídeo, LPS, entretanto, o LPS de *N. meningitidis* não contém repetições do antígeno-O como em outras bactérias entéricas gram-negativas, por este motivo seu LPS é denominado lipooligosacarídeo, LOS (LEWIS E RAM, 2014).

Atualmente existem cinco cepas com o genoma completo, sequenciado, que fornecem informações importantes sobre esse microrganismo (PIZZA et al., 2000; TETTELIN et al., 2000; SCHOEN et al., 2008; BUDRONI et al., 2011; PIET et al., 2011).

Além das informações fornecidas pelo sequenciamento do genoma, há trabalhos na literatura, entre eles o de Tsolakos et al., (2010) que identificam as proteínas presentes nas vesículas de membrana externa, as OMV.

Em *N. meningitidis*, as principais proteínas que compõe a membrana externa, e que são facilmente visíveis em gel de SDS-PAGE corado com azul de Comassie, são as cinco proteínas majoritárias de classe: classe 1 ou Porina A, PorA uma porina cátion específica, que possui massa molecular de 44 a 47kDa; classe 2/3 ou Porina B, PorB (o gene *porB* possui dois alelos sendo a expressão mutuamente exclusiva), com massa molecular de 33 a 42 kDa; classe 4 ou proteína de redução modificável, Rmp com massa molecular de 33 a 34 kDa; classe 5 ou Opa/Opc, conhecidas como proteínas de opacidade, de adesão e invasão, com massa molecular de 25 a 30 kDa (POLLARD e FRASCH, 2001 WRIGHT et al., 2002).

Além das cinco proteínas majoritárias *N. meningitidis* possui proteínas reguladas pelo íon ferro conhecidas pela sigla IRP (iron regulated proteins). Estas proteínas, como o próprio nome diz, constituem um grupo de glicoproteínas reguladas pelo íon ferro, e são expressas quando *N. meningitidis* está exposta a

baixa concentração ou na ausência deste íon (PETTERSSON et al., 2006). As principais proteínas reguladas pelo ferro são TpbA e TpbB que atuam como receptor de transferrina, possuem massa molecular de 93-98 kDa e 68-85 kDa respectivamente e anteriormente eram chamadas de Tbp1 e Tbp2 (PERKINS-BALDING, RATLIFF-GRIFFIN e STOJILJKOVIC, 2004).

Outra proteína comumente presente é a proteína de alta massa molecular, a *Neisseria* adesina A, conhecida pela sigla NadA. É uma proteína associada à adesão e à invasão celular, presente na superfície dos meningococos com massa molecular variando de 170 a 190 kDa (POLLARD e FRASCH, 2001).

Neisseria meningitidis pode ser tipificada, de forma tradicional, em **sorogrupos** determinados pelas diferentes estruturas dos polissacarídeos capsulares; em **sorotipos** determinados pelas proteínas de membrana externa classe 2 ou 3 (porina B); em **soro-subtipos** determinados pelas proteínas de membrana externa classe 1 (porina A); e em **imunotipos** determinados pelo lipooligossacarídeo (figura 1). Estas tipificações são realizadas utilizando anticorpos que reconhecem epítomos de superfície expostos na cápsula ou membrana externa (VAN DEUREN, BRANDTZAEG e VAN DER MEER, 2000).

Figura 1 – Representação das estruturas de membrana de *Neisseria meningitidis* envolvidas na tipificação.

Fonte: adaptado de JOLLEY et al. in FROSC & MAINDEN, 2006

Por volta de 1995 começou a ser utilizado um novo método de tipificação baseado na identificação de sequências de nucleotídeos de 6 fragmentos internos de genes altamente conservados (MAIDEN et al., 1998). Trata-se do método de tipificação por sequência de multilocus (MLST). Os fragmentos são amplificados por PCR, purificados e sequenciados. A cada sequência única de um locus, é designado um número de alelo, e a cada combinação única de alelos é atribuído um número de “sequence type” (ST) que são cadastrados nos bancos de dados de MLST, para microrganismos patogênicos. Esse método é utilizado para a epidemiologia global por apresentar resultados mais precisos do que as tipificações tradicionais (JOLLEY et al. in FROSCHE; MAIDEN, 2006; RACLOZ; LUIZ 2010; <http://neisseria.org/nm/typing>; <http://www.mlst.net> <http://pubmlst.org/neisseria/>).

Apesar da importância da identificação por MLST, a divisão por sorogrupo, sorotipo, soro-subtipo ainda é muito utilizada em laboratórios de vigilância epidemiológica quando se faz necessária a identificação rápida de uma cepa emergente, para determinar a melhor abordagem para uma intervenção vacinal.

1.1.1 Metabolismo

N. meningitidis é capaz de catabolizar completamente a glicose através da via Entner-Doudoroff (ED) e da via das Pentoses (PP). A via glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) não é funcional devido à ausência da enzima fosfofrutoquinase. Pela ação da enzima piruvato-desidrogenase, o piruvato proveniente da via ED é convertido em acetil-CoA, que entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) que gerará precursores de biossíntese, coenzimas reduzidas e ATP. *N. meningitidis* não possui a enzima malato-hidrogenase, para

oxidar malato a oxalacetato, a bactéria utiliza uma malato-quinona-oxidoreductase, FAD dependente (BAART et al., 2007; BAART et al., 2008).

N. meningitidis não cresce em condições de anaerobiose. Análises genômicas indicaram que este organismo possui enzimas que são inibidas na ausência de oxigênio (ANJUM et al., 2002). O mecanismo para obtenção de energia desta bactéria é a fosforilação oxidativa. *N. meningitidis* utiliza NADH ou FADH como doadores de elétrons, e o oxigênio ou nitrito como aceptores finais na cadeia de transporte de elétrons para gerar gradiente de prótons que será utilizado pela ATP-sintase para produção de ATP. O poder redutor, NADPH, é obtido na via das pentoses e na via ED (BAART et al., 2007; BAART et al., 2008).

1.1.2 Doença meningocócica

A doença meningocócica acomete pessoas de todas as faixas etárias, porém a maior incidência é em crianças menores de 5 anos de idade, sobretudo nos menores de 1 ano (Centro de Vigilância Epidemiológica CVE, 2010). *N. meningitidis* pode invadir o epitélio da faringe, disseminar-se na corrente sanguínea e causar septicemia, ou ainda, causar meningite. A gravidade da doença e o espectro são variáveis, alguns indivíduos têm meningite, sem evidências de meningococcemia ou sepse, enquanto outros podem apresentar meningococcemia variando de leve a grave (LEWIS e RAM, 2014).

As meningites bacterianas são resultado de um processo de diferentes etapas que refletem a habilidade do patógeno para atravessar a mucosa da orofaringe, sobreviver e replicar na corrente sanguínea e eventualmente atravessar a barreira hemato-encefálica (COUREUIL et al., 2012).

O primeiro passo na colonização meningocócica é a adesão nas células epiteliais da nasofaringe mediada pelo pili do tipo IV. Esta proteína também está envolvida em muitas fases do processo de infecção, tais como a adesão às células endoteliais, agregação bacteriana, motilidade, migração e transformação (COUREUIL et al., 2012; PIZZA e RAPPUOLI, 2014).

A adesão é então mediada pelas proteínas de opacidade, Opa e Opc, que se ligam aos componentes de moléculas de adesão e da matriz extracelular. Embora Pili, Opc e Opa representem as mais importantes e mais estudadas adesinas do meningococo, antígenos adicionais têm sido descritos como tendo importância na adesão, tais como NhhA (*Neisseria hia/ hsf* homólogo), App (proteína de adesão e penetração) e NadA (*Neisseria adesina A*). A presença de múltiplas adesinas com diferentes especificidades de receptores sugere que elas possam interagir cooperativamente com diferentes receptores nas mesmas células alvo, ou podem atuar em diferentes fases durante a infecção, mediando a adesão de *Neisseria* para diferentes tipos de células em diferentes locais (PIZZA e RAPPUOLI, 2014).

As infecções geralmente têm início abrupto e podem evoluir rapidamente alcançando uma taxa de letalidade de 10-20%. Dentre os sobreviventes, em até 20 % dos casos, a doença pode evoluir com sequelas podendo os pacientes apresentar surdez, déficit neurológico e necessidade de amputação de extremidades (CVE, 2010). Estima-se que 63% dos casos de bacteremia por *N. meningitidis* estejam associados à meningite (COUREUIL et al., 2012).

A doença meningocócica é endêmica no Brasil, com ocorrências periódicas de surtos epidêmicos em diversos municípios. Os coeficientes de incidência são de aproximadamente dois casos para cada 100.000 habitantes, mas estima-se que

esses números sejam ainda maiores devido a problemas na identificação dos agentes etiológicos. Dos casos notificados, 40% a 50% ocorrem em crianças menores de cinco anos de idade, sendo a maioria dos casos em lactentes no primeiro ano de vida (SAFADI, BEREZIN e OSELKA, 2012).

No Brasil, a letalidade também é alta, em torno de 18 a 20%, e chega a quase 50% nos casos de meningococemia. Na tabela 1 encontram-se os números de casos confirmados de meningite meningocócica e o número de óbitos, no Brasil, no período de 2002 a 2013. Pode-se observar que ainda ocorrem muitas mortes em decorrência desta doença, caracterizando um sério problema de saúde pública.

Tabela 1 – Casos confirmados de meningite por *Neisseria meningitidis* e número de óbitos, no Brasil, no período de 2002 a 2013.

Ano	Casos confirmados	Número de óbitos
2002	3727	704
2003	3344	674
2004	3654	737
2005	3313	699
2006	3050	625
2007	2425	487
2008	2616	508
2009	2904	608
2010	3003	616
2011	2835	605
2012	2522	539
2013	2083	440

Fonte: (SINAN)/SVS/MS

Dados atualizados em 07/08/2014

A colonização assintomática da nasofaringe por *N. meningitidis* caracteriza o estado de portador. Esse estado ocorre em 5% a 10% em adolescentes e adultos, podendo chegar a mais de 50% em dormitórios ou quartéis durante as epidemias (SAFADI, BEREZIN E OSELKA, 2012; LEWIS e RAM, 2014). A colonização assintomática raramente leva à doença invasiva. Uma combinação de fatores que incluem o potencial invasivo da cepa (cepas hipervirulentas) e a ausência de

defesas imunológicas contra a cepa invasora pode contribuir para o desenvolvimento da doença.

No que diz respeito à incidência da doença meningocócica, os principais sorogrupos são A, B, C, W e Y. Na tabela 2, é possível observar a maior incidência dos sorogrupos B e C nos últimos anos no Brasil (*SINAN/SVS/MS*, dados em dezembro/ 2014).

A progressão da doença meningocócica é extremamente rápida, e mesmo com o avanço da terapia com antibióticos e com a diminuição da fatalidade, a vacinação profilática permanece como a melhor abordagem para a prevenção da doença meningocócica.

Tabela 2 - Casos confirmados notificados de meningite meningocócica por etiologia e sorogrupo no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.

Sorogrupo	2011	2012	2013	2014
Ignorado/Em branco	397	371	150	148
A	1	5	1	1
B	121	114	35	39
C	514	476	128	138
Y	15	14	7	4
W	42	25	15	22
Total	1092	1006	336	352

Fonte: Ministério da Saúde/SVS (SINAN, 2013)

Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net

1.1.3 Vacinas

Desde o começo da década de 20, do século XX, há relatos de vacinas contra a meningite meningocócica. As primeiras vacinas eram inicialmente compostas de células de bactérias inativadas por calor e que causavam sérias reações adversas, provavelmente devido ao alto teor de endotoxinas (MORLEY e POLLARD, 2001).

Durante a Segunda Guerra Mundial devido ao grande número de casos da doença meningocócica a busca por uma vacina foi retomada, desta vez, com enfoque no polissacarídeo capsular purificado (MORLEY e POLLARD, 2001).

As vacinas meningocócicas atualmente disponíveis têm como antígeno o polissacarídeo capsular que pode ser ou não ser conjugado a uma proteína carregadora. AS vacinas de polissacarídeos são bivalentes (grupos A e C), trivalentes (grupos A, C e W135), ou tetravalente (grupos A, C, W135 e Y). Nas vacinas conjugadas (sorogrupos A, C, W135 e Y), o polissacarídeo capsular está covalentemente ligado ao toxóide tetânico, ou à toxina diftérica mutante atóxica, CRM₁₉₇ (SAFADI, BEREZIN e OSELKA, 2012).

No Brasil, a vacina conjugada contra meningite meningocócica tipo C faz parte do Calendário Nacional de Vacinação desde 2010. O esquema de vacinação consiste em duas doses, uma dose aos 3 e outra aos 5 meses de idade e um reforço entre o 12º e 15º mês. A vacina polissacarídica contra o meningococo A/C pode ser utilizada em situações específicas, como por exemplo, em ações de controle de surto (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015)

Para o sorogrupo B, vacinas polissacarídicas falham na indução de anticorpos bactericidas (ZOLLINGER e MORAN, 1991). O polissacarídeo capsular de *N. meningitidis* sorogrupo B (ácido α 2-8-N-acetil neuramínico) é pouco imunogênico devido a sua semelhança química com um oligômero do ácido siálico presente na membrana do tecido cerebral de humanos. A produção de uma vacina com o polissacarídeo B poderia gerar efeitos de tolerância imunológica, ou possíveis

reações autoimunes devido à semelhança entre estas moléculas (POLLARD e FRASCH, 2001).

Desta forma, antígenos não capsulares passaram a ser utilizados no desenvolvimento de vacinas contra o sorogrupo B. As primeiras vacinas de proteínas de membrana externa foram imunogênicas em animais, mas não houve resposta de anticorpos bactericidas em humano (MORLEY e POLLARD, 2001; SADARANGANI e POLLARD, 2010).

Outra abordagem para vacinas não capsulares foi utilizar vesículas de membrana externa (OMV) onde as proteínas se encontram em sua forma nativa. As vesículas de membrana externa são resultantes de evaginações desta membrana e são liberadas constantemente durante o crescimento do organismo (DEVOE e GILCHRIST, 1973; POOLMAN, 1995; BEVERIDGE, 1999). A figura 2 apresenta um esquema da formação e composição dessas vesículas, onde podem ser observadas as principais proteínas presentes na membrana externa, o polissacarídeo capsular e o lipooligossacarídeo.

Figura 2 – Imagem representativa da liberação das vesículas de membrana externa de *N. meningitidis*.

Fonte: modificado de (TAN, CARLONE E BORROW, 2010)

Devoe e Gilchrist (1973) referem-se a essas vesículas como “cell wall blebs”, Beveridge, (1999) assim como Mashburn-Warren, Mclean e Whiteley (2008), utilizam o termo “membrane vesicles”, (MVs), Pérez et al. (2007) referem-se às vesículas como “proteoliposome” ou “Adjuvante Finlay Proteoliposome 1” AFPL1, mas o termo mais comumente encontrado na literatura é outer membrane vesicle ou OMV.

As OMVs apresentam interesse imunogênico porque são constituídas de todos os componentes presentes na superfície da membrana externa da bactéria, isto é, polissacarídeos, fosfolipídeos, lipooligossacarídeos e principalmente proteínas (DEVOE e GILCHRIST, 1973). Quando na corrente sanguínea as OMVs são capazes de iniciar a ativação do sistema complemento e, podem assim, redirecionar a atividade para longe do meningococo, mascarando os efeitos bactericidas do complemento. Além disso, as OMV aumentam a concentração de LOS na corrente

sanguínea aumentando a resposta pró-inflamatória e consequentemente aumentando os danos (TAN, CARLONE e BORROW, 2010).

Estudos das primeiras vacinas com vesículas de membrana externa durante o final dos anos 70 e início dos 80 mostraram um aumento de anticorpos bactericidas no soro em 70 a 80% dos adultos vacinados, após uma única dose (FRASCH, 1995).

A primeira vacina comercializada baseada nas OMVs foi a vacina cubana VA-MENGOC-BC[®] (Finlay Institute, Havana, Cuba) desenvolvida pelo Instituto Finlay. A vacina é composta por OMVs da cepa predominante no país, polissacarídeo do sorogrupo C e uma preparação de proteínas de membrana externa de massa molecular entre 65-95 kDa adsorvidas ao hidróxido de alumínio. Esta vacina foi utilizada em Cuba com um esquema de três doses. A eficiência estimada dessa campanha de vacinação chegou a 83% (MORLEY e POLLARD, 2001; SADARANGANI e POLLARD, 2010; PANATTO et al., 2011).

Esta mesma vacina foi utilizada no Brasil, com um esquema de duas doses, para conter uma epidemia causada por outra cepa do sorogrupo B. A eficiência obtida foi de 70%-74% em crianças com idade entre 4 e 9 anos mas se mostrou ineficiente em crianças menores de 2 anos com apenas 37% de proteção. Resultados similares com diferentes vacinas de OMVs foram reportados para o Chile, Noruega e Nova Zelândia como podem ser observadas na tabela 3 (MORLEY e POLLARD, 2001; PANATTO et al., 2011).

Tabela 3 - Resumo dos estudos com vacinas de vesículas de membrana externa contra *N. meningitidis*

Local	Período de estudo	Vacina	Incidência antes da vacinação*	Nº de doses	Nº de pessoas vacinadas	Eficácia ou efetividade da vacina
Cuba ¹	1987–1989	VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	14,4	2	106,000	83%
Inque, Chile ²	1987 – 1989	B:15:P1.3	20	2	40,811	51%
Noruega ³	1988–1991	MenBvac B:15:P1.7,16	25 (13-21 anos)	2	171,800	57,2%
São Paulo, Brasil	1989–1990	VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	2,07 (1-6 anos)	2	2.4 milhões	47-74%
Santiago, Chile	1994	MenBvac B:15:P1.7,16 VA-MENCOG-BC B:4:P1.15	5,9	3	543	0-90%
Roterdã, Holanda	1996	Exavalent PorA-OMV		3	337	16-100%
Nova Zelândia ⁴	2004–2008	MeNZB B:4:P1.7–2,4	17	3 ou 4	1,032,239	73%
Normandia França	2006-2009	MenBvac B:15:P1.7,16	18-30	2+1 3+1	26,014	37-88%
EUA ⁵	2011	NOMV		3	36	41-81%

¹Finlay Institute^{2,5}Walter Reed Army Institute of Research³Norwegian Institute of Public Health⁴Novartis Vaccines and Norwegian Institute of Public Health

* Nº casos/100,000 habitantes

Adaptado de (TAN, CARLONE E BORROW, 2010; PANATTO et al., 2011)

Com a necessidade de desenvolver vacinas mais abrangentes, nos anos 2000, foi iniciado o estudo chamado de vacinologia reversa. Foram selecionados 350 potenciais antígenos por análises computacionais. Essas proteínas foram expressas em *Escherichia coli* e utilizadas para imunizar camundongos. Cinco antígenos promissores foram selecionados para a formulação da vacina da Novartis,

5CVMB (rMenB) (SADARANGANI e POLLARD, 2010; PANATTO et al., 2011). Durante os vários estudos esta vacina passou por melhoramentos e teve seu nome alterado para 4CMenB, a atualmente possui o nome comercial de Bexsero®.

Entre 2008 e 2010 foram realizados estudos clínicos de fase 2/3 no Chile com a vacina 4CMenB. Estudos iniciais de fase 1 demonstraram que a adição de OMV é necessária para aumentar a cobertura da vacina contra as diferentes cepas. Esta vacina é constituída de OMV de *N. meningitidis* cepa NZ98/254 e de 5 proteínas: NadA, NHBA, GNA1030, fHbp e GNA2091. Esses 5 antígenos estão na forma de 3 proteínas, a NadA e duas recombinantes fusionadas. A NHBA fusionada com a GNA1030 e GNA2091 com fHbp. A imunogenicidade desta vacina foi comprovada pelo aumento do título do soro com atividade bactericida em 90% dos participantes (FINDLOW et al., 2010; SADARANGANI e POLLARD, 2010; PANATTO et al., 2011; SANTOLAYA et al., 2012). Apesar da vacinologia reversa ter sido lançada como grande solução para a produção de vacinas, trata-se de um processo de desenvolvimento demorado, como quase todas as vacinas, e a vacina 4CMenB não dispensa o uso de OMVs em sua composição para aumentar sua abrangência. Esta vacina foi licenciada em 2014 para uso em clínicas na Europa.

Outra vacina em desenvolvimento formulada com base nas técnicas de biologia molecular é a vacina da Wyeth, atualmente da Pfizer, que foi formulada com base na lipoproteína 2086. Esta proteína tem a capacidade de se ligar ao fator H do complemento humano, impedindo a formação de complexos de lise do soro. A lipoproteína 2086 pode ser classificada na subfamília A, que corresponde a variante 2 e variante 3 e na subfamília B corresponde à variante 1. A vacina recombinante bivalente da proteína 2086, em ensaio de fase 2 com adolescentes, obteve aumento significativo da atividade bactericida do soro contra oito cepas virulentas de *N.*

meningitidis sorogrupo B testadas. Ensaios futuros investigarão a abrangência, a robustez e a eficácia desta vacina (RICHMOND et al., 2012).

Outra abordagem possível para a produção de uma vacina para o sorogrupo B é o desenvolvimento de uma vacina de OMV baseada na bactéria comensal *Neisseria lactamica*.

1.2 *Neisseria lactamica*

Neisseria lactamica e *Neisseria meningitidis* ocorrem na nasofaringe de seres humanos (GOLD et al., 1978). Elas são muito similares entre si bioquimicamente (HOLLIS, WIGGINS e WEAVER, 1969). *N. lactamica* é um dos primeiros microrganismos a colonizar a faringe de neonatos. Em torno de quatro anos de idade, cerca de 60% das crianças já foram portadoras de *N. lactamica* em algum momento.

A proteção contra a doença meningocócica é associada com a presença de anticorpos bactericidas, contra *N. meningitidis*, no soro. Esses anticorpos são adquiridos progressivamente ao longo dos primeiros anos de vida, período no qual a presença desta bactéria não é muito observada na nasofaringe (OLIVER et al., 2002). Provas imunológicas e epidemiológicas sugerem que a presença de *N. lactamica* contribui para o desenvolvimento dessa imunidade natural, relacionada com a idade, contra a doença meningocócica, provavelmente devido ao desenvolvimento de anticorpos contra muitas estruturas de superfície em comum com *N. meningitidis* (FINNEY et al., 2008).

Neisseria lactamica não possui cápsula, nem a proteína de membrana de classe 1 ou porina A. Sendo assim, qualquer proteção fornecida por este organismo não seria sorogrupo ou soro-subtipo específicas (BENNETT et al., 2005; GORRINGE et al., 2009)

Bennett, et al. (2005) sugerem que devido a essas características e à similaridade com *N. meningitidis*, *N. lactamica* pode ser usada para induzir proteção contra infecções com o meningococo, usando células inteiras inativadas, OMVs ou proteínas de membrana externa.

Em estudos iniciais Oliver et. al., (2002) e Gorringer, et. al., (2005) imunizaram camundongos via subcutânea com OMVs de *N. lactamica* e *N. meningitidis*. O título de soro obtido em ensaios de ELISA (utilizando a bactéria *N. meningitidis* como antígeno) foi semelhante entre os soros contra OMV de *N. lactamica* e contra OMV de *N. meningitidis*. Apesar de não ter sido observado atividade bactericida no soro contra as OMVs de *N. lactamica*, os animais imunizados com as OMV deste organismo resistiram ao desafio com as diferentes cepas testadas de *N. meningitidis*.

Li et al.,(2006) obtiveram anticorpos bactericidas contra as cepas de *N. meningitidis* ao imunizarem camundongos com *N. lactamica* viva, por via intraperitoneal em contraste com o observado por Oliver et al., (2002). Os autores sugerem que esses resultados podem ser explicados pelas diferentes linhagens de camundongos utilizadas e diferentes vias de administração.

Além do uso como antígeno vacinal Gorringer et al., (2009), levantam a possibilidade da combinação das OMVs de *N. lactamica* com outras vacinas atuando como adjuvante e como antígenos adicionais. Sardiñas et al., (2006) também

chamam a atenção para o uso destas vesículas como adjuvante de mucosas para antígenos heterólogos.

O estudo da biologia da bactéria comensal *N. lactamica*, bem como o estudo de suas proteínas de membrana externa surge como uma alternativa porque é uma das primeiras bactérias a colonizar a orofaringe de neonatos e porque está envolvida com a imunidade natural contra a doença meningocócica, além de ser uma bactéria não patogênica, facilitando seu estudo, sob o ponto de vista da biossegurança.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial antigênico das vesículas de membrana externa de *Neisseria lactamica* como antígeno vacinal contra a meningite meningocócica causada por *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B. Comparar *N. meningitidis* e *N. lactamica* quanto à cinética de cultivo e produtividade das OMVs; e quanto à composição proteica e potencial antigênico de suas vesículas.

2.2 Objetivos específicos

Comparar a cinética de cultivo de *N. meningitidis* e *N. lactamica* em cultivo descontínuo, em biorreator, para a produção de OMV.

Analisar o potencial antigênico das vesículas de membrana externa de *Neisseria lactamica* e *Neisseria meningitidis* e sua reatividade cruzada.

Analisar o potencial antigênico de proteínas de OMV selecionadas de *N. lactamica*.

Identificar as proteínas de *N. lactamica* e *N. meningitidis* com potencial antigênico, por espectrometria de massas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os fluxogramas abaixo (figuras 3 e 4) apresentam as etapas do processo de cultivo de *N. lactamica* e *N. meningitidis* para a obtenção de OMV, para o preparo das vacinas.

Figura 3 – Fluxograma das etapas do processo de cultivo e purificação das OMV

Figura 4 – Fluxograma das etapas de obtenção das vacinas.

3.1 Microrganismos

Utilizou-se *Neisseria lactamica* cepa N.799/98 e *Neisseria meningitidis* sorogrupo B cepa N.44/89 em ampolas liofilizadas, ambas provenientes do banco de cultura do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

3.2 Lote semente e lote trabalho

O lote semente foi preparado a partir da ressuspensão do conteúdo das ampolas com material liofilizado. Esta suspensão foi inoculada em meio semi-sólido de ágar Müller-Hinton (MÜLLER e HINTON, 1941) com 1% de soro equino normal em tubos inclinados, em atmosfera de CO₂, a 36 °C por cerca de 20 horas para *N.*

lactamica e 14 horas para *N. meningitidis*. Ao final deste período as colônias de *N. lactamica* e de *N. meningitidis* foram ressuspensas em meio de Catlin sem ferro, com 1% de soro equino ao qual foram adicionados 30% v/v de glicerol como crioprotetor. O material aliquotado foi mantido em nitrogênio líquido à -196 °C.

O lote trabalho foi preparado a partir de um criotubo do lote semente e todo o procedimento de cultivo foi semelhante ao descrito para o lote semente.

3.3 Cultivos

Para a ativação do inóculo das duas espécies de *Neisseria* foram descongelados criotubos do lote trabalho a 36 °C, e a suspensão bacteriana foi inoculada em tubos contendo meio de ágar Müller-Hinton (AMH). Os tubos foram mantidos inclinados, a 36 °C, em atmosfera rica em CO₂.

Passado o tempo de incubação de cada organismo, 28 h para *N. lactamica* e 14 h para *N. meningitidis*, o micro-organismo foi ressuspendido com 3,0 mL do meio líquido e transferido para erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultura. Os frascos foram mantidos em agitador rotativo a 200 - 250 rpm, 36 °C. Ao final do período determinado para cada organismo, 11 horas para *N. lactamica* e 3 horas para *N. meningitidis*, foi feita a leitura da densidade óptica com comprimento de onda de 540nm DO_{540nm} e calculado o volume de inóculo para que a DO_{540nm} inicial no experimento a ser realizado fosse de aproximadamente 0,15.

Para os cultivos em meio líquido foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Meio de Catlin sem ferro com 1 g/L de extrato de levedura ultrafiltrado, MC-YE;

- Meio de Catlin modificado por Santos et al., (2012) com o dobro das concentrações dos cinco aminoácidos, e o dobro da concentração de lactato de sódio, MC2LAA;

- Meio de Catlin modificado por Santos, como explicado acima, e acrescido de 2 g/L de extrato de levedura ultrafiltrado, MC2LAA-YE.

A composição e preparação dos meios de cultura utilizados podem ser encontradas no anexo 1.

Os ensaios foram conduzidos em agitador rotativo com *N. meningitidis* e em biorreator com *N. lactamica* e *N. meningitidis*.

O cultivo de *N. meningitidis* em agitador rotativo, ensaio 1, foi realizado utilizando-se o meio MC2LAA para a preparação do inóculo e para o cultivo. O volume calculado de inóculo foi distribuído em 10 erlenmeyers que foram cultivados a 36°C, 200 rpm por 6 horas. As amostras, retiradas a cada hora, foram utilizadas para obtenção da biomassa DO_{540nm}. O método de coloração de Gram e a análise no microscópio óptico foram realizados no início e durante os experimentos para verificar a morfologia e esterilidade do cultivo. Esse cultivo foi realizado com o objetivo de obter vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* para estudos de viabilidade do projeto.

Os cultivos de *N. meningitidis* em biorreator foram realizados em duplicata. Os quatro cultivos realizados foram divididos em 2 grupos. Os cultivos do grupo A, ensaios 2 e 3, foram realizados utilizando-se o MC2LAA. Os cultivos do grupo B,

ensaios 4 e 5, foram realizados utilizando-se o MC2LAA-YE. Em todos os cultivos a preparação do inóculo foi em MC2LAA.

Os cultivos de *N. lactamica* em biorreator foram realizados em duplicata. Os dois cultivos, ensaio 6 e 7, foram realizados em MC2LAA-YE, que foram reunidos no grupo C. Para *N. lactamica* não foram realizados cultivos no meio MC2LAA, isto é, sem extrato de levedura, porque, ao contrário do que ocorre com *N. meningitidis*, não há crescimento de *N. lactamica* sem este componente.

Na tabela 4 estão apresentados os grupos, os ensaios, as condições de cultivo, meios de cultura e microrganismos utilizados.

Tabela 4 – Ensaios realizados e condições de cultivo.

Grupos	Ensaios	Organismo	Meio de cultura	Condições
A	2 e 3	<i>Neisseria meningitidis</i>	MC2LAA	Biorreator 12h
B	4 e 5	<i>Neisseria meningitidis</i>	MC2LAA-YE	Biorreator 12h
C	6 e 7	<i>Neisseria lactamica</i>	MC2LAA-YE	Biorreator 12h

O biorreator (Bioflo[®] 2000, New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA) de 5 L de volume de trabalho foi esterilizado com tampão fosfato (PBS) à 120 °C por 30 min. O meio foi filtrado para o interior de cada dorna com o sistema de filtração esterilizante Opticap da Millipore, com membrana de porosidade 0,22 µm.

Os cultivos foram realizados com temperatura de 36 °C, vazão de ar de 1L/min (agitação superficial), e pH inicial 7,0. A agitação, controlada automaticamente, variou de 250 rpm a 850 rpm, para manter a concentração de

oxigênio dissolvido em 30% de saturação de ar. Esses parâmetros foram monitorados por meio da interface do reator com o software LabView/ UFSCar versão 7.1. Foram colhidas amostras de 50 mL a cada hora. Os cultivos em biorreator tiveram a duração de 12 horas.

Na tabela 5 pode-se observar o resumo das etapas do processo e das condições de cultivo utilizadas para cada micro-organismo.

Tabela 5 – Etapas do processo e condições de cultivo

Etapas do processo	Condições de cultivo	<i>Neisseria lactamica</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
Descongelamento*	Volume	250 µL	200 µL	200 µL
	Nº de tubos de AMH	8	2	10
	Tempo de incubação**	28h	14h	14h
Inóculo (em meio líquido)	Nº de Erlenmeyers	5	2	10
	Duração do cultivo	11h	3h	3h
	Agitação	200 rpm	250 rpm	250 rpm
	Meio de cultura	MC-YE	MC2LAA	MC2LAA
Ensaio em agitador rotativo	Erlenmeyers	-	10	-
	Duração do cultivo	-	6 h	-
	Agitação	-	250 rpm	-
	Meio de cultura	-	MC2LAA	-
Ensaio em biorreator	Volume do inóculo para	330-400 ml	-	330-400 ml
	DO inicial de 0,15			
	Meio de cultura	MC-YE ou MC2LAA-YE	-	MC2LAA ou MC2LAA-YE

*Realizado em tubos com meio de cultura ágar Müller-Hinton com 1% de soro equino normal.

**A 36°C em ambiente de baixa tensão de O₂.

3.4 Coeficiente de concentração celular entre Massa seca e DO_{540nm}

Para a conversão da absorbância, em DO_{540nm}, para biomassa em massa seca foram utilizados valores experimentais obtidos no laboratório por Gonçalves

(2012) e Santos (2007). O coeficiente de correlação entre essas duas variáveis foi obtido por meios de gráficos utilizando-se os valores experimentais. Para *Neisseria lactamica* o valor obtido foi de 0,44 e para *Neisseria meningitidis* foi de 0,46.

3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para obter a velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{\max}$ foi calculado o coeficiente angular da regressão linear do logaritmo neperiano Ln (DO) em função do tempo.

A produtividade em célula e a produtividade em produto foram calculadas utilizando as equações a seguir:

$$\text{Prod X} = \frac{X_{\max} - X_i}{t_{fx} - t_i} \quad (\text{g/L.h}) \quad (1)$$

$$\text{Prod P} = \frac{P_{\max} - P_i}{t_{fp} - t_i} \quad (\text{mg/L.h}) \quad (2)$$

Onde:

$X_{\max}$: concentração celular máxima;

X_i : concentração celular inicial;

$P_{\max}$: concentração de produto máxima;

P_i – concentração de produto inicial;

t_{fx} – tempo de cultivo correspondente a $X_{\max}$;

t_{fp} – tempo de cultivo correspondente a $P_{\max}$;

t_i – tempo inicial igual a zero.

Os fatores globais de conversão foram calculados utilizando as equações a seguir:

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\text{máx}} - P_i}{S_i - S_{\text{pmáx}}} \quad (\text{mg/g}) \quad (3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\text{máx}} - X_i}{S_i - S_{\text{xmáx}}} \quad (\text{g/g}) \quad (4)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\text{máx}} - P_i}{X_{\text{máx}} - X_i} \quad (\text{mg/g}) \quad (5)$$

Onde:

$X_{\text{máx}}$: concentração celular máxima;

X_i : concentração celular inicial;

S_i : concentração de substrato inicial;

$S_{\text{pmáx}}$: concentração de substrato quando a concentração do produto é máxima;

$S_{\text{xmáx}}$: concentração de substrato quando a concentração celular é máxima;

$P_{\text{máx}}$: concentração de produto máxima;

P_i : concentração de produto inicial.

3.6 Purificação das OMVs

As bactérias foram retiradas das amostras por meio de centrifugação a 15.417 x g (10.000 rpm), 10 °C, por 30 min. O precipitado contendo as bactérias foi descartado. Ao sobrenadante, que continha as OMV, foi adicionado azida sódica na concentração final de 0,02%.

O sobrenadante da centrifugação foi ultracentrifugado a 156.667 x g (30.000 rpm), 15 °C por 3 h. Após a ultracentrifugação o precipitado, contendo somente as OMV, foi ressuspensionado em 0,02% de azida. As OMV foram armazenadas a 4°C e o sobrenadante a -20 °C para posterior análise.

Nos cultivos em biorreator esse procedimento foi realizado com as amostras coletadas de hora em hora no decorrer do cultivo. No ensaio realizado em agitador rotativo foi realizada somente com a amostra da hora final do cultivo.

3.7 Análise do sobrenadante ultracentrifugado das amostras dos cultivos em biorreator

A concentração do lactato de sódio, substrato fonte de carbono, e de ácidos orgânicos, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (Shimadzu, modelo 10 ADvp). Amostras, diluídas 5 vezes com ácido sulfúrico 25 mM, foram injetadas na coluna Aminex[®] HPX-87H (BioRad, Hercules, California, USA) e como fase móvel foi utilizado ácido sulfúrico na concentração de 5 mM, com fluxo de 0,6 mL/min a 60 °C. A detecção foi efetuada em comprimento de onda de 210 nm. As concentrações dos ácidos foram calculadas por meio do software Class VP, versão 6.2 utilizando como padrão soluções de lactato de sódio, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético.

A concentração de amônia nas amostras foi determinada com o kit para detecção de amônia HI 93700 da HANNA (Hanna Instruments Srl, Ronchidi Villafranca, Itália) em comprimento de onda de 470 nm, com leitura de 0,00-3,00 mg/L e sensibilidade de 0,01 mg/L.

3.8 Determinação da concentração de OMV

A concentração de OMV foi determinada indiretamente pela dosagem de proteínas totais, realizada pelo método de Lowry et al., (1951). As amostras de 50 µL a 200 µL com volume acertado com água destilada para volume final de 1 mL foram incubadas com 3,0 ml de um reagente constituído de tartarato de sódio 2% (p/v) e sulfato de cobre 1% (p/v) diluídos em 1:100 em solução de carbonato de sódio 2% (p/v) e hidróxido de sódio 0,1 M por 10 min à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 300 µL do reagente Folin-Ciocalteu 1M e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 750nm. A curva padrão foi determinada empregando-se albumina bovina em concentrações variando entre 25 µg/mL a 250 µg/mL. A concentração das amostras foi calculada por meio da curva padrão considerando-se o fator de diluição.

A concentração de proteínas obtida por este método foi utilizada para preparar e ressuspender amostras para a eletroforese e para o preparo das vacinas.

3.9 Perfil eletroforético e Densitometria

Para identificação do padrão protéico das OMVs, alíquotas foram desidratadas no “speed-vac”. As amostras foram ressuspensas e aplicadas no gel em uma concentração final de 30 µg de proteína em 10 µL de amostra. O tampão de amostra continha como agente denaturante 5% de mercaptoetanol e 4 M de ureia. Foram preparados géis SDS-PAGE com 12,5% de poliacrilamida, com pente de 10 linhas. Imediatamente antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram aquecidas a 100°C por dois min. Foi utilizado o padrão de massa molecular

“Amersham High-Range Rainbow Molecular WeightMarkers” (GE Healthcare UK limited). Os géis foram corados em azul de Coomassie para visualização dos componentes proteicos.

Uma vez concluído o gel de SDS-PAGE, cada amostra foi selecionadas no densitômetro Bio-Rad GS-800 e foram quantificadas as bandas com auxílio do software Quantity One, (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Foi quantificada a porcentagem da densidade da banda selecionada em relação à soma das densidades de todas as demais bandas na respectiva amostra do gel. A partir destes valores foi possível aferir as concentrações das proteínas constituintes de cada banda pela proporção dessas em relação aos valores de proteína total da respectiva amostra do gel.

3.10 Preparação dos antígenos

3.10.1 Vacinas de OMV

Suspensões contendo OMVs de *N. lactamica* ou OMVs de *N. meningitidis* foram dialisadas em água destilada estéril para a remoção da azida de sódio. Foi preparado 4mL de vacina em solução salina 0,85%. As preparações vacinais foram aliqüotadas e armazenadas a 4 °C. Cada animal recebeu uma dose da vacina contendo 2 µg de OMV em 0,1 mL de solução salina.

3.10.2 Vacinas de Componentes protéicos de OMV de *N. lactamica*

Em géis SDS-PAGE 12,5% de poliacrilamida, espessura de 1 mm com pente preparativo foram aplicadas 200 µg de OMV/ 100 µL de tampão de amostra. Foram usadas amostras da última hora de cultivo.

Os géis foram corados em azul de Coomassie para que os componentes protéicos fossem evidenciados. As bandas foram cortadas, isoladas, e armazenadas a -20 °C em frascos identificados. Para a preparação das vacinas, as bandas isoladas foram maceradas e ressuspensas em 2 ml de água destilada estéril. Essas soluções foram sonicadas com 5 pulsos de 6 segundos com 40% de amplitude. O volume foi acertado de forma que, foram preparados 4 ml de cada vacina em solução salina, as preparações vacinais foram aliquotadas e armazenadas a 4 °C. As proteínas selecionadas para os ensaios de imunização foram identificadas como bandas 7, 8 e conjunto proteico 9 que podem ser visualizadas na figura 5.

Figura 5 – SDS-PAGE das OMVs de *N. lactamica* do cultivo em biorreator. As bandas indicadas como 7, 8 e o conjunto de bandas indicado como 9 foram isoladas para utilização no ensaio de imunização.

Essas proteínas foram selecionadas por apresentarem potencial imunogênico em ensaios preliminares.

As concentrações utilizadas em cada formulação vacinal foram calculadas com base nos resultados obtidos por densitometria no aparelho Quantity One, Bio-Rad Laboratories e podem ser observadas na tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações utilizadas em cada formulação vacinal nos diferentes ensaios.

Proteína	Ensaio I µg/100ml	Ensaio II µg/100ml
Prot. 7	1,6	0,8
Prot.8	4,2	4,2
Prot.9*	0,5	1,0

* Prot 9 corresponde a uma mistura de proteínas, sendo duas mais evidentes: a Prot9a com 0,25 µg/100ml e a Prot 9b com 0,23 µg/100ml no Ensaio I; e Prot9a 0,52 µg/100ml e Prot 9b 0,49 µg/100ml no Ensaio II.

3.11 Imunizações

Os ensaios realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, sob o protocolo nº 802/11.

Foram utilizados camundongos fêmeas de 3 semanas da raça swiss, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Foram alojados cinco animais por gaiolas que permaneceram em sala climatizada a 25 °C.

Em ambos os ensaios, os antígenos preparados foram inoculados por via subcutânea no dorso do animal, seguindo um esquema de três doses, uma dose a cada duas semanas. Em torno de uma semana após a última dose foi realizada a sangria retrorbital dos animais. A composição vacinal está descrita no item 3.10.

3.11.1 Ensaio vacinal I

O ensaio I foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade do projeto, sendo assim, os antígenos utilizados nas preparações vacinais provêm de experimentos iniciais. As OMVs de *N. meningitidis* provêm de um cultivo em agitador rotativo em MC2LAA (ensaio 1). As OMVs de *N. lactamica* provêm de um cultivo em biorreator em MC-YE realizado pela mestre Beatriz Isva Gonçalves, no Laboratório de Meningite do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (GONÇALVES, 2012).

Com estas amostras de OMVs foram preparadas vacinas com a proteína 7, proteína 8, conjunto protéico 9, vacinas de OMV de *N. lactamica* e vacinas de OMV de *N. meningitidis*. Foram utilizados ao todo 55 camundongos 10 animais para cada uma das 3 proteínas selecionadas de *N. lactamica*, 10 animais para as vacinas de OMV de *N. meningitidis*, 10 para as vacinas de OMV de *N. lactamica* e 5 animais controle que receberam solução salina.

3.11.2 Ensaio vacinal II

As OMVs de *Neisseria lactamica* utilizadas para a preparação das vacinas neste ensaio provêm do ensaio 6, grupo C (tabela 4). Com estas OMVs foram preparadas vacinas com a proteína 7, proteína 8 , conjunto protéico 9 e vacinas de OMV de *N. lactamica*.

As OMVs de *N. meningitidis* utilizadas neste ensaio provêm do ensaio 2, grupo A e ensaio 4, grupo B (tabela 4). Com estas OMVs foram preparadas as vacinas de OMV de *N. meningitidis*. Foram utilizados ao todo 60 camundongos: 10 animais para cada uma das 3 proteínas selecionadas de *N. lactamica*, 10 animais

para as vacinas de OMV de *N. lactamica*, 10 animais para as vacinas de OMV de *N. meningitidis* do ensaio 2, e 10 animais para as vacinas de OMV de *N. meningitidis* do ensaio 4.

3.12 Obtenção do soro

Para a obtenção do soro, o sangue de cada animal foi coletado em frasco identificado. Esses frascos foram incubados à 36 °C por 1 h, resfriados a 4 °C por 1 h, centrifugados a 2.000 rpm, 4 °C, por 15 minutos e foi coletado o soro, no sobrenadante. Para a preparação de um pool do soro dos camundongos de cada grupo, foram utilizados 100 µL de soro de cada animal. Os soros, de cada indivíduo e de cada “pool”, foram aliquotados e armazenados a -20 °C.

3.13 Imunoblote

Empregou-se um gel de SDS-PAGE de 12.5% poliacrilamida com pente preparativo. Foi aplicado por gel 100 µg de OMV/ 100 µL tampão de amostra.

Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para a membrana Hybond de nitrocelulose (Amersham Biosciences Little Chalfon, UK), utilizando-se o método semi-dry. Neste método, utiliza-se tampão de transferência composto por 40 mL de tampão Tris/glicina/SDS, (15,1 g/L de Tris, 94 g/L de glicina e 5 g/L de SDS) em 40 mL de etanol, e 120 mL de água destilada. As condições de transferência foram: corrente fixa de 250 mA, 100 V de tensão, por 2 h. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas em solução de 0,1% de Ponceau S em

5% de ácido acético para evidenciar o padrão de bandas das proteínas transferidas e o padrão de massa molecular.

O bloqueio da membrana foi realizado com 1% de leite desnatado diluído em TBS-tween (0,1 M tris, 1,5M NaCl, 500 µL de tween, em 900 mL H₂O destilada), por 24h a 4 °C. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por duas horas nos soros obtidos nas imunizações, nas diluições apresentadas na tabela 7. Terminado o período de incubação, a membrana foi lavada em TBS-tween com 1% de leite desnatado e a seguir incubadas com o soro IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:2000. A revelação foi realizada por quimioluminescência em foto-documentador (Gel Logic 2200 Imaging System, Rochester, NY, EUA).

Tabela 7 – Diluições dos soros utilizadas nos imunoblotes

Membrana	Soro utilizado	Concentração
OMV de <i>N. meningitidis</i>	Soro contra OMV de <i>N. meningitidis</i>	1:5000
	Soro contra OMV de <i>N. lactamica</i>	1:200
	Soro contra Proteína 7	1:1000
	Soro contra Proteína 8	1:2000
	Soro contra Proteína 9	1:2000
OMV de <i>N. lactamica</i>	Soro contra OMV de <i>N. lactamica</i>	1:5000
	Soro contra Proteína 7	1:1000
	Soro contra Proteína 8	1:2000
	Soro contra Proteína 9	1:2000

3.14 ELISA

Foram realizados imunoblotes com os soros obtidos nos ensaios um e dois, e ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) com os soros do segundo ensaio para uma análise do plano de imunizações.

Placas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com 0,30 µg de OMV de *N. meningitidis* grupo B diluídas em tampão carbonato bicarbonato e mantidas a 4 °C por aproximadamente 14 horas. Para determinação da concentração de anticorpos, foram feitas em cada placa curvas padrão de IgG (Southern Biotech, Birmingham, AL, Estados Unidos).

As placas foram lavadas três vezes com uma solução tampão salina fosfato Tween20 (PBS-T) ao início de cada etapa.

Passadas às 14 horas de incubação, as amostras foram bloqueadas com 10% de leite desnatado em PBS-T e incubadas a 37 °C por 1 hora. Cumprido o tempo, o pool do soro de cada grupo foi diluído seriadamente em PBS-T contendo 1% de “bovine serum albumin” (BSA, sigma Aldrich). As placas foram mantidas a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. Subsequentemente, foi feita a incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo produzido em cabras por 1 hora a 37 °C. Por fim, adicionou-se o anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (Southern Biotech) e incubou-se por 1 hora a 37 °C. A reação foi revelada pela adição de solução de 10 mg de o-phenilenediamina (OPD, Sigma Aldrich) em 20 mL de tampão citrato fosfato, contendo 10 µL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 8M por poço. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Uniscience) a 429nm. A determinação da concentração de anticorpos (em ng/mL) foi realizada com base nas curvas padrão de cada placa.

3.15 Espectrometria de massas

Foram realizadas análises de proteínas das vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* e *N. lactamica*. As proteínas indicadas na figura 6 foram selecionadas para análise.

Figura 6 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV obtidas na 12^a hora do cultivo do ensaio 6 com *Neisseria lactamica* e do ensaio 2 com *Neisseria meningitidis*.

As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 12,5% e as bandas selecionadas foram cortadas com o auxílio de lâminas e armazenadas em solução descorante à – 5 °C.

As mostras foram processadas em colaboração com a Dra. Júlia P. C. da Cunha, Pesquisadora Científica do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada projeto CAT-cepid, do Instituto Butantan.

3.15.1 Digestão '*In gel*'

A descoloração das bandas foi realizada adicionando-se às amostras 0,5 mL da solução descorante (metanol 50%, ácido acético 5% em água milliQ) e incubando-se por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi retirada e foram acrescentados 0,5 mL da solução descorante por 1 hora à temperatura ambiente. Após a descoloração as amostras foram desidratadas com 200 µL de acetonitrila 100% por 5 minutos por duas vezes. Uma vez desidratadas, adicionou-se 30 µL de solução de redução de ditioneitol (DTT) 10 mM, e incubou-se por 1 hora, descartando-se o sobrenadante após este período.

Após a redução, procedeu-se à alquilação das proteínas "*in gel*" por adição de 30 µL da solução de iodoacetamida (IAA) 50 mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos sob proteção da luz. Cumprido o tempo, descartou-se o sobrenadante. A seguir, o gel foi lavado com 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, os géis foram desidratados com 200 µL de acetonitrila 100%, por 5 minutos. Estes procedimentos de reidratação e desidratação, à temperatura ambiente, foram repetidos. Após esses procedimentos os géis foram secos no concentrador rotativos a vácuo.

Os géis foram hidratados com 16 µL (800 ng de tripsina) da solução de tripsina (SIGMA, Sequencing grade) por 30 min em banho de gelo. O excesso de solução de tripsina foi removido e foi adicionado 5 a 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM. O gel foi incubado por cerca de 12h a 37 °C na presença desta solução. Cumprido o tempo, foi adicionado 10 µL da solução 1 de extração (5% de ácido fórmico em água milliQ) e incubado por 10 min à temperatura ambiente. Após este período a solução foi centrifugada e o sobrenadante armazenado em microtubo.

Para a segunda etapa de extração foram adicionados 12 µL da solução 2 de extração (5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila) e realizada incubação à temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao mesmo tubo que continha o sobrenadante extraído com a primeira solução. Esse procedimento foi realizado duas vezes para garantir que toda a amostra fosse extraída. A amostra foi então seca no concentrador rotativo a vácuo por aproximadamente 40 minutos de forma a restar aproximadamente 1 µL. (HANNA, et al., 2000).

3.15.2 Digestão tripsínica em solução

Amostras, 150 µg de OMV de *N. lactamica* e 150 µg de OMV de *N. meningitidis*, foram secas no concentrador rotativo a vácuo e ressuspendidas em 6 M de ureia 100 mM de Tris. A seguir, adicionou-se 5 µL de agente redutor (200 mM de ditioneitol 100 mM de Tris). Essa solução foi incubada por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente. Após a redução procedeu-se à alquilação das proteínas por adição de 20 µL da solução de iodoacetamida (200 mM, 100mM de Tris). As amostras foram incubadas por 1 hora sob proteção da luz. A seguir, para consumir a iodoacetamida restante, a solução foi incubada com 20 µL do agente redutor por 1 hora. Cumprido o tempo, a concentração de ureia foi diluída para 0,6 M, e 3 µg de tripsina foram adicionados. As amostras foram incubadas por aproximadamente 12 horas a 37 °C. A reação foi interrompida ajustando o pH para 5 com ácido acético. A solução concentrada e os sais e a ureia foram retirados utilizando o Sep-Pack C18.

3.15.3 Espectrometria de massas em LTQ-XL

A amostra seca continha os peptídeos que foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e injetados (4,5 ml) a um espectrômetro de massas LTQ-XL (Thermo) através de um cromatógrafo nano (Eksigent) a ele acoplado. As amostras foram dessalinizadas e concentradas usando uma pré-coluna (Symmetry C18, 180 µm x 20 mm - Waters) e a separação dos peptídeos foi realizada em coluna capilar de fase reversa C18 (10 cm x 75 µm - Waters) a um fluxo de 400 nL/min. Os peptídeos foram eluídos da coluna em gradiente linear de 5% a 40% de fase móvel B durante 15 minutos e por mais 4 minutos até 80% de B. Fase móvel A era composta de ácido fórmico 0.1% em acetonitrila 5% e fase móvel B de ácido fórmico 0.1% em 100% de acetonitrila. Os peptídeos eluídos foram diretamente injetados no espectrômetro de massas via electrospray. Os espectros MS/MS dos dez picos mais intensos com duas a quatro cargas na função MS foram adquiridos automaticamente, no modo de aquisição dependente dos dados (DDA). A voltagem do capilar foi 2,5 kV. Todas as análises foram efetuadas em modo positivo de ionização. Os espectros foram adquiridos de 50-2000 m/z.

Os dados em formato *raw foram processados utilizando Trans Proteomic Pipeline (TPP) do “Systems Biology Institute” de Seattle-EUA e analisados no MASCOT e SEQUEST/Proteome Discover (Thermo) usando banco de dados do Banco de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI) (taxonomia de *Neisseria meningitidis* e *Neisseria lactamica*) com FDR 1%. Para o processamento feito no MASCOT foram utilizados os seguintes parâmetros: carbamidometilação da cisteína como modificação fixa; oxidação da metionina como modificações variáveis; tolerância MS1 de 1.5 Da e MS2 de 0.8 Da.

3.16 Microscopia eletrônica

Foram realizadas análises das bactérias *N. meningitidis* e *N. lactamica* assim como de suas OMVs. As amostras de *N. lactamica* provieram do ensaio 6, grupo D, e as amostras de *Neisseria meningitidis* foram provenientes do ensaio 1, grupo D e ensaio 2 grupo E. As análises foram realizadas em colaboração com a Dr. Sylvia Mendes Carneiro do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Utilizou-se a técnica de contrastação negativa. Foram utilizadas grades de cobre de 300 meshes recobertas por película de parlódio/ carbono. A essas películas foram aplicados 7 μ L de suspensão de OMV, após 3 min, o excesso de líquido foi retirado com auxílio de papel de filtro e imediatamente colocou-se 7 μ L de molibdato de sódio pH 7,2 durante 10 segundo. Retirou-se todo o líquido com o papel filtro e deixou-se secar totalmente. As grades foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Alemanha), operando a 80 kV. As imagens foram capturadas por uma câmera CCD MegaView III por meio do programa iTEM- Universal TEM ImagingPlatform (Olympus Soft ImagingSolutionGMBh, Germany), e salvas em extensão TIF.

3.17 Determinação do potencial Zeta, tamanho e polidispersão

Diâmetros médios foram obtidos pelo ajuste dos dados de distribuições de tamanho log-normal, que não discrimina entre uma, duas ou mais populações diferentes e considera que todas as partículas dispersam como pertencente a uma única população de Gauss.

Para os dados da distribuição de tamanho (polidispersão), a montagem foi realizada por meio do software do aparelho usando um algoritmo específico (non-negatively constrained least squares NNLS) que permite alcançar distribuições multimodais.

O potencial-zeta (ζ) foi determinado a partir da mobilidade eletroforética μ em NaCl 1 mM e a equação de Smoluchowski : $\zeta = \mu\eta / \epsilon$, onde η é a viscosidade média e ϵ a constante dielétrica média. Cada valor é apresentado como uma média de pelo menos 3 medições individuais $\pm$ desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivos

Foram escolhidas neste trabalho as condições de cultivo e os meios de cultura que obtiveram melhores resultados de biomassa e concentração de OMV, em cultivo descontínuo, com base em trabalhos desenvolvidos anteriormente (GONÇALVES, 2012; SANTOS *et al.*, 2012) no Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

Para *N. meningitidis* foi selecionado o meio de Catlin sem ferro, com o dobro das concentrações dos cinco aminoácidos, e o dobro da concentração de lactato de sódio, MC2LAA. Os aminoácidos e demais componentes e suas respectivas concentrações encontram-se no anexo 1. Inicialmente foi realizado um cultivo em agitador rotativo para análise da viabilidade do projeto. Em seguida foram realizados cultivos em biorreator, em duplicata utilizando o MC2LAA e o MC2LAA-YE, grupos A e B respectivamente (tabela 4).

Para *N. lactamica* foi selecionado o meio de Catlin modificado, com a adição de extrato de levedura, pois ao contrário do que ocorre com *N. meningitidis*, não há crescimento de *N. lactamica* no meio definido de Catlin. Para os ensaios de viabilidade do projeto, foram utilizadas OMVs provenientes de um cultivo em biorreator no MC-YE. Em seguida foram realizados cultivos em biorreator em MC2LAA-YE, grupo C (tabela 4).

Durante o cultivo foram analisados o crescimento, a biomassa, concentração de OMV, de lactato, de ácidos orgânicos, de amônia, e foram coletados dados de pH, temperatura, agitação e porcentagem de oxigênio dissolvido. Os valores de cada cultivo, isoladamente, podem ser encontrados nos anexos 2,3,4,5, e 6.

4.1.1 Grupo A

Os ensaios do grupo A foram realizados com *Neisseria meningitidis* em biorreator em MC2LAA. Os valores apresentados são a média dos ensaios 2 e 3. Os resultados experimentais podem ser observados na tabela 8, figuras 7 e 8 e anexo 2 e 3.

Tabela 8 - Resultados experimentais do **Grupo A** - *Neisseria meningitidis* em MC2LAA. Destaque em cinza para os valores máximos de DO_{540nm} e OMV.

Tempo (hora)	DO 540nm	Massa seca(g/L)	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,17	0,08	0,94	15,05	0,30	0,61	0,05	0,09	0,11
1	0,36	0,17	1,69	14,06	0,37	0,55	0,15	0,09	0,11
2	0,83	0,38	2,40	12,86	0,69	1,02	2,26	0,28	0,09
3	1,52	0,70	2,57	12,05	0,84	1,15	2,86	0,27	0,11
4	1,53	0,70	6,60	9,94	1,02	4,74	6,64	0,85	0,10
5	1,53	0,70	10,21	8,48	1,27	6,81	7,75	1,38	0,10
6	1,57	0,72	10,34	6,79	1,43	7,43	9,97	1,68	0,11
7	1,54	0,71	11,85	4,99	1,51	6,46	7,60	2,03	0,10
8	1,56	0,72	17,66	5,39	2,20	9,90	10,48	2,73	0,09
9	1,60	0,74	17,81	3,44	2,25	8,03	9,74	2,95	0,10
10	1,54	0,71	21,04	2,59	2,42	7,91	10,11	2,89	0,10
11	1,41	0,65	25,73	1,75	2,50	6,55	7,14	3,02	0,10
12	1,38	0,63	35,05	1,59	2,81	6,63	7,50	3,13	0,10

Figura 7 - Curvas de biomassa, concentração de OMV, concentração de lactato e ácidos orgânicos, em biorreator. **Grupo A** - *Neisseria meningitidis* em MC2LAA.

Figura 8 - Dados obtidos em tempo real de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e agitação. **Grupo A** – *Neisseria meningitidis* em MC2LAA.

No grupo A, o crescimento exponencial ocorreu do início até a 3^a hora quando a DO_{540nm} foi de 1,52. Entre a 3^a e a 4^a hora, o crescimento entra em fase

estacionária e assim permanece até a 9ª hora, a partir da qual há uma tendência ao declínio até a 12ª hora quando o cultivo foi finalizado. A média da biomassa máxima em DO_{540nm} foi de 1,60 e em massa seca foi 0,74 g/L na 9ª hora. A média da biomassa final em DO_{540nm} foi 1,38 e em massa seca 0,63 g/L. A velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{\max}$ foi de 0,74 h⁻¹.

Ocorre liberação de vesículas durante todo o cultivo, mas durante a fase estacionária, a velocidade de liberação é maior, conforme sugere a inclinação da curva (figura 7). O valor máximo da concentração de OMV foi de 35,05 mg/L na 12ª hora.

Os valores de DO_{540nm} e de concentração de OMV obtidos neste ensaio foram inferiores aos alcançados por Santos et. al., (2012), nas mesmas condições de cultivo, que obteve na 12ª hora valores que variaram de 2,42 a 4,59 de DO_{540nm} e de 49,45 a 64,81 de concentração de OMV. Apesar dos valores inferiores, os perfis das curvas de crescimento foram semelhantes aos observados por Santos et. al., (2012) e por Schoen et al.,(2014); e Baruque-Ramos et al., para meningite C (2006).

Ao final do cultivo o lactato não foi totalmente consumido restando 10,5% (1,59 g/L), da concentração inicial. Houve produção contínua de acetato e succinato e a concentração destes no final do cultivo foi de 2,81 e 3,13 g/L respectivamente. A concentração final de malato e citrato foi de 10,48 a 9,90 g/L. A concentração de amônia (NH₃) é praticamente constante durante o cultivo, variou de 0,09 g/L a 0,11 g/L. O pH variou de 7,1 a 8,08, aumentando ao longo do cultivo. A agitação máxima de 712 rpm foi na 3ª hora.

Fu et. al., (1995) ao cultivar *N. meningitidis* B em meio definido com glicose como fonte de carbono, não observaram acúmulo de ácidos orgânicos no

sobrenadante. Baruque-Ramos et. al., (2006) observaram uma pequena liberação de malato e citrato em cultivos de *N. meningitidis* C em meio de Frantz. Estes resultados da literatura diferem do observado neste trabalho, nos cultivos do grupo A, nos quais encontramos altas concentrações de malato e citrato. Baruque-Ramos et. al., (2006) sugerem que a liberação destes ácidos possa estar associada a uma atividade reduzida do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA). Por outro lado nossos resultados sugerem que a atividade reduzida do TCA seria consequência da atividade reduzida da cadeia respiratória. O esquema do TCA e cadeia respiratória estão apresentados adiante na figura 11.

4.1.2 Grupo B

Os ensaios do grupo B foram realizados com *Neisseria meningitidis* em biorreator em MC2LAA.-YE. Os valores apresentados são a média dos ensaios 4 e 5. Os resultados experimentais podem ser observados na Tabela 9, figuras 9 e 10 e anexos 4 e 5 .

Tabela 9 – Resultados experimentais do **Grupo B**. *Neisseria meningitidis* em MC2LAA-YE
Destaque em cinza para os valores máximos de DO_{540nm} e OMV.

Tempo (hora)	DO 540nm	Massa seca(g/L)	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,18	0,08	1,17	14,57	0,37	0,60	0,17	0,19	0,08
1	0,49	0,23	1,52	14,49	0,86	0,58	0,76	0,19	0,07
2	1,19	0,55	2,95	13,38	0,68	0,50	3,25	0,18	0,09
3	2,35	1,08	4,56	11,87	1,15	0,28	3,70	0,19	0,07
4	2,80	1,29	7,02	11,03	1,70	0,13	0,20	0,22	0,11
5	2,89	1,33	8,07	10,21	1,98	0,00	0,05	0,23	0,11
6	2,91	1,34	17,65	9,94	2,30	0,00	0,04	0,21	0,13
7	2,98	1,37	15,26	9,92	2,61	0,00	0,04	0,00	0,14
8	2,93	1,35	17,55	9,55	2,66	0,00	0,04	0,00	0,16
9	3,04	1,40	24,27	9,33	2,79	0,00	0,04	0,00	0,17
10	3,26	1,50	22,40	8,86	3,00	0,00	0,04	0,00	0,19
11	3,28	1,51	26,56	8,27	3,27	0,00	0,04	0,00	0,17
12	3,46	1,59	27,26	7,43	3,44	0,00	0,04	0,00	0,20

Figura 9 - Curvas de biomassa, concentração de OMV, concentração de lactato e ácidos orgânicos, em biorreator. **Grupo B** - *Neisseria meningitidis* em MC2LAA-YE.

Figura 10 - Dados obtidos em tempo real de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e agitação. **Grupo B** - *Neisseria meningitidis* em MC2LAA-YE.

No grupo B o crescimento exponencial ocorreu do início até a 3ª hora de cultivo quando a DO_{540nm} foi de 2,35. Entre a 3ª e a 4ª hora, o crescimento entra em fase estacionária e assim permanece até a 9ª hora, a partir da qual parece haver uma tendência de retomada do crescimento. A média da biomassa máxima em DO_{540nm} foi 3,46 e em massa seca foi 1,59 g/L na 12ª hora. A velocidade máxima específica de crescimento, μ_{max} , foi $0,85\ h^{-1}$.

Ocorre liberação de vesículas durante todo o cultivo e a concentração máxima de OMV é de 27,26 mg/L na 12ª hora. Embora seja possível observar uma alteração na inclinação da curva, a partir da 9ª hora, indicando uma diminuição da velocidade de liberação das OMVs, justamente no período em que ocorre retomada do crescimento pelo microrganismo.

O lactato não foi totalmente consumido até a 12ª h quando o cultivo foi interrompido restando ainda 7,43 g/L, portanto, 50% da concentração inicial. Houve produção e aumento contínuo da concentração de acetato durante todo o cultivo, chegando a 3,44 g/L. A concentração de malato aumentou do início até a 3ª hora e voltou a diminuir chegando a praticamente zero na 5ª hora. Citrato e succinato não atingiram níveis detectáveis. A concentração de amônia, inicialmente em torno de 0,08 g/L aumentou a partir da 4ª hora e na 12ª hora, quando o cultivo foi interrompido, era de 0,20 g/L. O pH variou de 7,17 a 7,96, aumentando ao longo do cultivo. A temperatura se manteve estável por volta de 36 °C. A agitação máxima observada foi de 850 rpm desde a 3ª hora até a 12ª hora.

Esses resultados sugerem que outra substância presente no extrato de levedura tenha sido utilizada como fonte de carbono alternativa ao lactato, pois na 12ª hora ainda restava cerca de 50% de sua concentração inicial.

O extrato de levedura contém diferentes carboidratos, entre eles a glicose e vários aminoácidos. Os substratos fonte de carbono utilizados por *N. meningitidis* são glicose, lactato, piruvato ou alguns aminoácidos (SCHOEN et al., 2014). A glicose é consumida preferencialmente pela via Entner-Doudoroff (ED) e em menor quantidade pela via das Pentoses (PP) (BAART et al., 2007; SMITH, TANG e EXLEY, 2007; SCHOEN et al., 2014). Em um meio composto por glicose e lactato, como o MC2LAA-YE, a glicose seria a primeira fonte de carbono a ser consumida e o lactato seria aproveitado como fonte de energia adicional já que pode ser imediatamente utilizado como substrato para o transporte de elétrons quando oxidado a piruvato e entrar diretamente no ciclo do ácido tricarboxílico como pode ser visto na figura 12 (BAART et al., 2007; SMITH, TANG e EXLEY, 2007; SCHOEN et al., 2014).

Figura 11 – Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa

Fonte: Adaptado de KEGG, 2014.

Essa atividade elevada do TCA demanda altas concentrações dos constituintes do ciclo como, por exemplo, 2-oxoglutarato (figura 11). Este composto pode ser formado a partir do ácido glutâmico na presença da enzima glutamato desidrogenase com liberação de amônia. O aumento gradativo da concentração de amônia sugere que possa ter havido consumo do ácido glutâmico para conversão em 2-oxoglutarato. Em seu trabalho Santos et. al., (2012) demonstram que, na ausência de glicose, o ácido glutâmico e o lactato são rapidamente consumidos por esta mesma cepa de *N. meningitidis*. Estes fatos os levaram a propor modificação do meio de Catlin com o dobro da concentração destes dois nutrientes. Uma possível consequência da conversão de ácido glutâmico em 2-oxoglutarato, além da formação de amônia, seria uma maior disponibilidade deste produto no TCA e, portanto, aumento da atividade do ciclo, maior consumo de oxigênio e maior produção de energia. Nestes ensaios foi observado que a agitação do biorreator, se manteve em 850 rpm, a velocidade máxima, a partir da 3ª hora até o final do cultivo, indicando alto consumo de oxigênio pelo microrganismo.

Baruque-Ramos et al., (2006), observaram em cultivos de *Neisseria meningitidis* C o aumento na formação de acetato em meio de Franz contendo extrato de levedura, porém não observaram formação de ácidos.

Figura 12 – Esquema da utilização de lactato por *N. meningitidis* para produção de energia e síntese de precursores dos constituintes da célula. Se a glicose está presente a gliconeogênese a partir do lactato fica inativada.

Fonte: Adaptado de: Smith, Tang e Exley (2007).

Fu et al., (1995), também mencionam a formação de acetato no cultivo de *N. meningitidis* B em meio contendo glicose. Nos cultivos do grupo B (figura 9 e 10), a agitação atingiu seu máximo de 850 rpm na 3ª hora e assim se manteve até o final do cultivo caracterizando uma possível limitação de oxigênio. Baart et. al., (2007), afirmam que quando *N. meningitidis* é cultivada em meio contendo glicose com sua capacidade oxidativa reduzida, seja por limitação de oxigênio ou por alterações metabólicas, ocorre acumulação de acetato.

4.1.3 Grupo C

Os ensaios do grupo C foram realizados com *Neisseria lactamica* em biorreator em MC2LAA.-YE. Os valores apresentados são a média dos ensaios 6 e 7. Os resultados experimentais podem ser observados na Tabela 10, figuras 13 e 14 e anexos 6 e 7.

Tabela 10 – Resultados experimentais do **Grupo C**. *Neisseria lactamica* em MC2LAA-YE
Destaque em cinza para os valores máximos de DO_{540nm} e OMV.

Tempo (hora)	DO 540nm	Massa seca(g/L)	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,19	0,08	2,88	14,51	0,36	0,67	0,13	0,24	0,09
1	0,43	0,19	2,57	14,07	0,47	0,88	1,29	0,23	0,10
2	0,85	0,38	5,01	12,84	0,69	1,47	2,81	0,21	0,13
3	1,58	0,70	8,40	11,42	1,05	3,34	2,32	0,19	0,10
4	2,56	1,14	15,00	8,40	1,69	6,90	0,14	0,14	0,08
5	3,43	1,52	28,02	5,05	2,66	6,37	2,70	0,14	0,07
6	5,14	2,28	50,57	1,20	4,27	3,04	1,55	0,20	0,08
7	5,28	2,34	53,36	0,14	5,23	2,48	0,11	0,31	0,07
8	5,77	2,56	69,56	0,08	4,23	2,21	0,06	0,28	0,10
9	5,78	2,57	115,36	0,15	3,07	1,86	0,05	0,19	0,09
10	5,74	2,55	127,93	0,28	2,72	1,49	0,22	0,19	0,11
11	4,94	2,20	156,25	0,29	2,82	1,21	0,31	0,18	0,10
12	4,03	1,79	130,34	0,25	3,29	0,94	0,44	0,19	0,12

Figura 13 - Curvas de biomassa, concentração de OMV, concentração de lactato, ácidos orgânicos, em biorreator. **Grupo C** - *Neisseria lactamica* em MC2LAA-YE.

Figura 14 - Dados obtidos em tempo real de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e agitação. **Grupo C** - *Neisseria lactamica* em MC2LAA-YE.

No grupo C, o crescimento exponencial ocorreu entre a 1ª e a 6ª hora quando a DO_{540nm} foi de 5,14. Entre a 6ª e a 7ª hora, o crescimento entra em fase estacionária e assim permanece até a 10ª hora a partir da qual começa a decair. A média da biomassa máxima em DO_{540nm} foi de 5,78 e em massa seca foi 2,57 g/L na 9ª hora. A velocidade máxima específica de crescimento μ_{max} foi $0,488h^{-1}$.

Ocorre liberação de vesículas durante todo o cultivo chegando a seu valor máximo de 156,25 mg/L na 11ª hora.

O lactato foi consumido desde o início até a 7ª hora onde sua concentração chegou a zero. O succinato manteve-se em baixas concentrações e variou de 0,14 g/L a 0,31g/L. São observados dois picos de malato na 2ª e na 5ª hora chegando a 2,81 g/L. As concentrações de acetato e citrato aumentam e depois diminuem no decorrer do cultivo. A concentração máxima de acetato é de 5,23 g/L na 7ª hora e a de citrato é de 6,90 g/L na 4ª hora, sendo observado um declínio na concentração inicialmente do citrato seguido pelo acetato.

A concentração de amônia oscila durante o cultivo, porém, dentro de uma faixa estreita de 0,07 g/L até 0,13 g/L. O pH variou de 7,1 a 8,9, aumentando ao longo do cultivo. A temperatura se manteve estável por volta dos 36 °C. A agitação máxima observada foi de 850 rpm entre a 4ª e a 6ª hora.

Os resultados de biomassa e de concentração de OMV destes ensaios são semelhantes aos de Gonçalves (2012) que nas mesmas condições de cultivo, obteve a biomassa máxima em torno de 6 em DO_{540nm} e 2,69 g/L de massa seca, e máxima concentração de OMV de 175 mg/L. O padrão de liberação de ácidos orgânicos também foi semelhante corroborando com a hipótese de que enquanto o

lactato está disponível para ser consumido, ocorre produção de citrato e acetato que são consumidos a partir do momento em que o lactato passa a ser limitante. O citrato é consumido e entra diretamente no TCA, ciclo do ácido tricarboxílico (figura 11), seguido do acetato que deve ser convertido em acetil-fosfato, que por sua vez tem que ser convertido em acetil-CoA para entrar no TCA (KEGG, 2014).

Nas horas iniciais, o ácido glutâmico é transformado em 2-oxoglutarato para suprir as necessidades do TCA, porém este mesmo composto é capaz de inibir indiretamente a expressão da enzima glutamato desidrogenase quando em altas concentrações. As variações na concentração de amônia neste ensaio ocorreram possivelmente em função da autorregulação dos compostos envolvidos e nas alterações metabólicas discutidas anteriormente (páginas 73-74).

4.1.4 Discussão geral dos cultivos

Foram realizados 6 cultivos divididos em 3 grupos. *N. meningitidis* foi cultivada no meio de Catlin modificado desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos, e no meio de Catlin modificado com adição de extrato de levedura, desenvolvido para *N. lactamica* que não cresce na ausência deste componente. Os valores máximos de biomassa e de concentração de OMV obtidos em cada grupo podem ser encontrados na tabela 11.

Tabela 11 – Comparação das médias dos valores máximos de biomassa em DO_{450nm} e de concentração de OMV nos ensaios em biorreator de *N. meningitidis* e *N. lactamica*.

Grupo	Organismo	Meio de cultura	Biomassa (DO _{540nm})	OMV (mg/L)
A	<i>Neisseria meningitidis</i>	MC2LAA	1,60	35,05
B	<i>Neisseria meningitidis</i>	MC2LAA-YE	3,46	27,26
C	<i>Neisseria lactamica</i>	MC2LAA-YE	5,78	156,25

São raros na literatura estudos de cinética de crescimento, biomassa e concentração de OMVs. Não encontramos nenhum trabalho onde *N. meningitidis* é cultivada em meio de Catlin com extrato de levedura. Embora esta modificação tenha levado a uma maior biomassa, a concentração de OMV obtida foi menor. Gonçalves havia chamado a atenção para o fato de que o extrato de levedura favorece a biomassa, mas não favorece o aumento da concentração de OMV em cultivos de *N. lactamica*.

Em todos os ensaios o perfil de liberação de OMV atingiu seus maiores valores na fase estacionária. Santos et. al, (2012) e Van De Waterbeemd et al.(2010; 2013) também observaram este padrão de liberação. Por outro lado, Baarte et al. (2007) e Fu et al. (1995) observaram que o momento de maior liberação de OMVs foi ao final da fase exponencial, quando observaram maior concentração das vesículas. Ainda que o mecanismo que controla a liberação de vesículas não esteja completamente esclarecido, algumas teorias sugerem que a exposição à limitação de nutrientes leva ao aumento da vesiculação (MASHBURN-WARREN, MCLEAN e WHITELEY, 2008; ELLIS e KUEHN, 2010; VAN DE WATERBEEMD et al., 2012).

O aumento na liberação de OMV nas horas finais de cultivo deve-se provavelmente a limitação de nutrientes, com ressalva para o grupo B onde nas 12 horas ainda não parecia ter atingido seu auge, nem de crescimento, nem de liberação de OMV.

Comparando-se os perfis das curvas de *N. meningitidis* e *N. lactamica* constata-se que os grupos A e B apresentam uma fase estacionária longa e bem definida, tendo início entre a 3ª e a 4ª hora e permanecendo até o final do cultivo (12ª). Por outro lado, *N. lactamica*, grupo C, entra em fase estacionária por volta da 6ª hora, tem uma fase estacionária curta, e entra em fase de declínio. Smith et. al., (2012), afirmam que cepas patogênicas de *N. meningitidis* possuem um tipo de metabolismo que torna este microrganismo mais resistente a limitações de oxigênio e/ou nutrientes, sendo este um possível fator de virulência. Talvez devido a este fato elas permaneçam na fase estacionária por tempo prolongado, por pelo menos até 20 horas (SANTOS, 2012), sem que a fase de declínio seja observada como em *N. lactamica*.

4.2 Parâmetros cinéticos

Os valores de concentração celular (X) foram calculados utilizando-se o coeficiente de concentração celular entre massa seca e DO_{540nm} obtido por Santos (2007), e Gonçalves (2012). Esses valores foram utilizados para calcular os fatores de conversão OMV/ lactato ($Y_{p/s}$), OMV/ biomassa ($Y_{p/x}$) e biomassa/ lactato ($Y_{x/s}$), e os valores de produtividade celular (Prod X) e produtividade de OMV (Prod P) de acordo com as equações citadas no item 3.5. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 – Valores de concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$); concentração de OMV máxima ($P_{m\acute{a}x}$); fatores de conversão OMV/lactato ($Y_{p/s}$); OMV/biomassa ($Y_{p/x}$); biomassa/lactato ($Y_{x/s}$); produtividade em biomassa (Prod X); produtividade em OMV (Prod P). Destaque para os valores máximos de cada parâmetro.

Grupo	Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$P_{m\acute{a}x}$ (mg/L)	$Y_{p/s}$ (mg/g)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Prod X (g/L.h)	Prod P (mg/L.h)
A	2	0,71	30	2,33	46,20	0,06	0,07	2,44
	3	0,77	40	2,72	56,35	0,07	0,09	3,25
B	4	1,58	27	3,74	17,04	0,22	0,13	2,13
	5	1,60	30	4,51	19,26	0,20	0,13	2,22
C	6	2,68	161	11,71	60,85	0,19	0,26	14,39
	7	2,64	152	9,95	58,17	0,17	0,32	13,50

Os valores de biomassa e concentração de OMV foram significativamente maiores no grupo C que contém os cultivos de *N. lactamica* em MC2LAA-YE, sendo os valores médios máximos de biomassa de 5.99 DO_{540nm} e de concentração de OMV de 162,25 mg/L. Esses valores são duas vezes maiores do que a média da biomassa máxima obtida para *N. meningitidis* no grupo B que foi de 3,46 DO_{540nm}, e quatro vezes maior que a média da concentração máxima de OMV obtida no grupo A de 35,06 mg/L. O grupo C obteve também os maiores valores de X_{max} , $P_{m\acute{a}x}$, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$, Prod X e Prod P.

Os valores de $X_{m\acute{a}x}$ do grupo B são 2 vezes o valor do grupo A, porém os valores de $P_{m\acute{a}x}$ são similares. A produtividade em biomassa também foi semelhante, porém os valores de produtividade de OMV e os valores de conversão de OMV por substrato $Y_{p/s}$ foram maiores no grupo B do que no grupo A. Esses resultados indicam que o extrato de levedura é mais importante para a formação da biomassa do que para a produção de OMV como já discutido anteriormente.

Os menores valores de $P_{\text{máx}}$ foram obtidos no grupo B, possivelmente, 12 horas de cultivo não foi tempo suficiente para o cultivo atingir seu máximo e se manter em nova fase estacionária. É importante ressaltar que até a 12ª hora quando o cultivo foi finalizado, o lactato ainda não havia sido totalmente consumido. Se os ensaios deste grupo tivessem seguido por um período maior, certamente os resultados seriam diferentes mesmo porque após a 9ª hora de cultivo a curva de biomassa e concentração de OMV tende a aumentar.

Quando se compara o cultivo de *N. lactamica* e *N. meningitidis* em biorreator, em MC2LAA-YE nas mesmas condições, *N. lactamica* apresentou maiores valores que *N. meningitidis* nos fatores de conversão de OMV/ lactato e OMV/ biomassa, na produtividade em biomassa, e produtividade em OMV e ainda nos valores máximos de biomassa e de concentração de OMV. Uma das vantagens do cultivo para a produção de OMV por *N. lactamica* em relação à *N. meningitidis* está no fato de apresentar maior produtividade no mesmo tempo de cultivo.

4.3 Microscopia Eletrônica

N. lactamica, *N. meningitidis*, bem como as vesículas de membrana externa de ambas foram analisadas por microscopia eletrônica para análise da morfologia e integridade das vesículas. As imagens obtidas estão apresentadas na figura 15.

Figura 15 – Microscopia eletrônica de *Neisseria meningitidis* (A, B), e de suas OMV (C), de *Neisseria lactamica* (D, E), e de suas OMV (F).

Na figura 15 pode-se observar a forma de diplococos de *N. meningitidis* e de *N. lactamica* e a liberação de vesículas. Nas figuras 22C e 22F observam-se os diferentes formatos das vesículas de membrana externa que podem ser tubulares, esféricas, e em “forma de raquete”.

4.4 Determinação do potencial Zeta, tamanho e polidispersão

Os resultados do potencial zeta, polidispersão e diâmetro médio ou diâmetro hidrodinâmico podem ser visualizados na tabela 13. As figuras 16 e 17 representam a distribuição de tamanho das vesículas de *N. lactamica* e *N. meningitidis* respectivamente. Cada valor é apresentado como uma média de pelo menos três medições individuais $\pm$ desvio padrão. A polidispersão é uma medida relativa da

variância da distribuição. Valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão. Já o potencial zeta reflete a carga de superfície das nanocápsulas, sendo que este parâmetro pode ser influenciado pela composição da partícula, meio dispersante, pH e força iônica presentes na solução.

Os valores de polidispersão indicam que as amostras de OMV de ambas as espécies apresentam partículas com diferentes diâmetros, como é possível observar nas figuras 16 e 17.

Tabela 13 – Potencial zeta, polidispersão e diâmetro médio das OMV de *N. meningitidis* e *N. lactamica*

Amostra	Potencial Zeta	Polidispersão	Diâmetro médio (nm)
OMV de <i>N. meningitidis</i>	-30,80 mV	0,321 ± 0,007	141,4 ± 3,9
OMV de <i>N. lactamica</i>	0 mV	0,306 ± 0,003	110,7 ± 2,6

Figura 16 – Distribuição de tamanho (diâmetro) das vesículas de *Neisseria lactamica*.

Figura 17 – Distribuição de tamanho (diâmetro) das vesículas de *Neisseria meningitidis*.

Partículas com carga negativa, *in vivo*, não apresentariam interação inespecífica com células que apresentam carga negativa. Por outro lado partículas com cargas positivas apresentariam eletrostáticas inespecíficas com superfície celular negativa (FOGED *et al.*, 2005). Essas propriedades das vesículas, de apresentarem carga neutra ou carga negativa, seriam então vantajosas para a produção de vacinas ou adjuvantes levando em conta a diminuição da interação inespecífica com diferentes tipos de células.

4.5 Perfil eletroforético

Foram feitos géis SDS-PAGE de um dos ensaios dos grupos A, B e C. O padrão protéico das OMVs pode ser observado nas figuras 18, 19 e 20.

Figura 18 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV de *Neisseria meningitidis*. Amostras coletadas na 3^a, 5^a, 7^a, 9^a, e 12^a horas de cultivo.
Grupo A

Figura 19 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV de *Neisseria meningitidis*. Amostras coletadas na, 4^a, 6^a, 8^a, 11^a, e 12^a horas de cultivo.
GrupoB. A seta sinaliza a presença das IRP na 12^a hora.

Figura 20 – Gel de eletroforese SDS-PAGE, 12,5% das amostras de OMV de *Neisseria lactamica*. Amostras coletadas na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a, e 12^a horas de cultivo. **Grupo C.** A seta sinaliza a proteína que se torna mais intensa ao longo do cultivo.

No grupo A (figura 18; tabela 4) no qual *N. meningitidis* foi cultivada em meio de Catlin modificado sem ferro observamos as IRPs entre 100 kDa e 70 kDa desde as horas iniciais. A proteína com aproximadamente 25 kDa, possivelmente uma proteína de opacidade, parece diminuir ao longo do cultivo.

No grupo B (figura 19; tabela 4) que continha extrato de levedura no meio de cultivo, as proteínas entre 100 kDa e 70 kDa, que correspondem às proteínas reguladas pelo íon ferro, as IRPs, não são evidenciadas entre a 2^a e 10^a hora de cultivo, e passam a ser visíveis na 12^a hora. O extrato de levedura adicionado ao meio contém 57,9 µg de ferro/g. Na presença de ferro, *N. meningitidis* expressa estas proteínas em menor quantidade, com o esgotamento do ferro ao longo do cultivo, a bactéria passa a expressar as IRPs em quantidades detectáveis por coloração em Comassie.

No grupo C (figura 20) observa-se que o padrão de banda é semelhante entre as diferentes horas de cultivo, com excessão da banda de proximadamente 35 kDa, indicada pela seta que se torna mais intensa com o passar das horas. Esta banda, em conjunto com outras amostras selecionadas foram submetidas à análises de espectrometria de massa, os resultados obtidos estão no item 4.6.

4.6 Espectrometria de massas

Foram realizadas análises com OMV de *Neisseria lactamica* e com OMV de *Neisseria meningitidis* para a identificação das proteínas presentes nas vesículas obtidas nos cultivos em biorreator. As proteínas selecionadas para imunização dos animais também foram analisadas por espectrometria de massas para identificação. Estas análises forneceram dados inéditos sobre a composição das vesículas de membrana externa das cepas estudadas.

Os dados obtidos por espectrometria de massas foram analisados no programa MASCOT fixando as taxonomias para *N. meningitidis* e *N. lactamica* no banco de dados do NCBI.

Foram identificadas 229 proteínas nas OMV de *Neisseria lactamica*, sendo 77 preditas como proteínas de membrana e 243 proteínas nas OMV de *N. meningitidis* sendo 54 preditas como proteínas de membrana (anexos 8 e 9).

As proteínas utilizadas nas imunizações, neste trabalho, foram isoladas e identificadas em comparação com o banco de dados, conforme mencionado acima e serão descritas a seguir. As demais proteínas encontram-se nos anexos 9 e 10.

A proteína 1 do gel de *Neisseria meningitidis* (figura 6, pág.55), foi identificada como proteína de classe 3, class 3 outer membrane protein [*Neisseria meningitidis*, gi:469098], também conhecida como porina B, PorB com massa molecular predita de 33,8 kDa.

A proteína 2 do gel de *Neisseria meningitidis* (figura 6), foi identificada como a proteína que se liga ao ferro-férrico, FbpA, iron ABC transporter substrate-binding protein [*Neisseria meningitidis* MC58, gi:15676534] com massa molecular predita de 35,8 kDa.

A proteína 3 do gel de *Neisseria meningitidis* (figura 6) foi identificada como proteína de classe 5, opacity protein [*Neisseria meningitidis*, gi|2367653], também conhecida como proteína de opacidade, Opa com massa molecular predita de 27 kDa.

Análises realizadas com as proteínas 7, e 8 do gel de *N. lactamica* (figura 6) identificaram que ambas as bandas são da mesma proteína, a porina B, major outer membrane protein P.IB [*Neisseria lactamica* ATCC 23970, gi|269215308]. Bennett et al. (2008), nomearam essa proteína como porina de *N. lactamica*, Por, com massa molecular predita de 34,5kDa.

A proteína 9a (figura 6) de *N. lactamica* foi identificada como a lipoproteína de competência, ComL, competence lipoprotein ComL [*Neisseria lactamica* ATCC 23970, gi:261400384] com massa molecular predita de 30,6 kDa. Enquanto que a proteína 9b (figura 6) foi identificada como a proteína de opacidade Opa/Opc, opacity protein opA58 [*Neisseria lactamica* ATCC 23970, gi|269214324], com massa molecular predita de 26,9 kDa.

4.7 Análise do potencial antigênico das OMVs de *N. meningitidis* e *N. lactamica* e de proteínas isoladas de *N. lactamica*

4.7.1 Ensaio vacinal I

Os soros obtidos a partir da imunização dos camundongos com as OMVs de *N. lactamica*, proteína 7, proteína 8, conjunto proteico 9, e OMV de *N. meningitidis* foram utilizados em imunoblotes contra a OMV de *N. lactamica* e *N. meningitidis*. Os resultados estão apresentados na figura 21, e nas tabelas 14 e 15.

Figura 21 - Imunoblote. A: OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose. Reatividade dos soros anti-proteína 7, P7 (linha 1), anti-proteína 8, P8 (linha 2), anti-conjunto proteico 9, P9 (linha 3) e anti-OMV de *N. lactamica* (linha 4). B: OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose grupo A, e reatividade dos soros anti-OMV de *N. lactamica*. C: Gel SDS-PAGE 12,5 % de OMV de *N. lactamica*.

Todos os pools de soros se mostraram reativos. O soro anti-OMV de *N. lactamica* reage com 7 proteínas (figura 21A linha 4) com massa molecular

compatível com: a proteína de adesão e penetração, App (183,2 kDa); a proteína ligadora de transferrina TbpA (101,9 kDa); a proteína de membrana externa 85, Omp85 (89,1 kDa); a proteína secretina do pilus, PilQ (78,4 kDa); a porina B, PorB (34,5 kDa); e a lipoproteína de competência ComL (30,6 kDa).

Vale a pena ressaltar que os valores de massa molecular, em kDa, variam dentro de certa faixa, na literatura. Também, uma mesma proteína, tem massa molecular com pequena diferença dependendo da espécie. Em geral os valores aqui assumidos, são os valores preditos, nos bancos de dados que por sua vez não são idênticos aos encontrados em géis de SDS-PAGE. Às vezes o que se mantém são os epítomos característico da proteína, não exatamente a proteína com a mesma massa molecular.

O soro anti-proteína 7 (figura 21A linha 1) reagiu com duas proteínas, correspondentes às bandas 7 e 8 do gel (figura 21C) uma com cerca de 42 kDa, e outra em torno de 34 kDa. Ambas PorB conforme os resultados obtidos na espectrometria de massas.

O soro anti-proteína 8 (figura 21A linha 2) reagiu com 3 proteínas correspondentes às bandas 3, 7 e 8 do gel (figura 21C). Estas bandas possuem massa molecular compatível com às proteína Omp85, e à porina B com 42 kDa e 34 kDa.

O soro anti-complexo proteico 9 (figura 21A linha 3) reagiu com duas proteínas com massa molecular compatíveis com: a proteína *N. lactamica*-específica, um tipo de receptor TonB dependente, com 73,2 kDa e a banda 9 que corresponde à lipoproteína de competência ComL com 30,6kDa.

Nas linhas 1, 2 e 3 observa-se reações que parecem ser inespecíficas, que revelam a proteína correspondente às bandas 1 e 2 da eletroforese (figura 21 C).

O soro anti-OMV de *N. lactamica* (figura 21B) reconhece 7 proteínas da OMV de *N. meningitidis* com massa molecular compatível com: a proteína de adesão e penetração App (159,9 kDa); a TbpA (101,8 kDa); a Omp85 (88,4 kDa); a PilQ (82,4 kDa); a Por A (39,8 kDa) e a PorB (33,0 kDa). As bandas 5 e 6 observadas no imunoblote, em torno de 46 a 48 kDa, estão na região da porina A de *N. meningitidis*. Gorringer (2009) menciona que *N. lactamica* não tem porina A embora Vaughan et al. (2006) mencione uma proteína hipotética de *N. lactamica* com 83% de similaridade com a PorA de *N. meningitidis*. A PorA encontrada na análise de espectrometria de massas da OMV de *N. meningitidis* tem massa molecular predita de 39,8 kDa, menor do que a encontrada na literatura. Dada a similaridade entre PorA e a proteína hipotética, é possível que o anticorpo contra essa proteína de *N. lactamica* tenha reconhecido a PorA de *N. meningitidis*. A massa molecular predita das proteínas mencionadas bem como seu gene index encontram-se na tabela 16.

4.7.2 Ensaio vacinal II

Soros obtidos com a imunização de camundongos com OMV de *N. lactamica*, proteína 7, proteína 8, complexo protéico 9, e OMV de *N. meningitidis* cultivada em MC2LAA, OMV de *N. meningitidis* cultivada em MC2LAA-YE, e OMV de *N. lactamica* foram utilizados em ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para quantificação dos anticorpos IgG contra OMV de *N. meningitidis* (figura 22) e em imunoblotes (figura 23) contra OMV de *N. lactamica* (ensaio 6 grupo C) e *N. meningitidis* (ensaio 2 do grupo A, tabela 4 pág. 40).

4.7.2.1 ELISA

Pelo método de ELISA foi possível observar a indução de IgG específica contra a OMV de *N. meningitidis* em camundongos imunizados com proteína 7, proteína 8, proteína 9, OMV de *N. lactamica*, OMV de *N. meningitidis* grupo A e *N. meningitidis* grupo B (figura 22) .

Figura 22 – Concentração (ng/mL) de anticorpos IgG séricos específicos contra OMV de *N. meningitidis* em animais submetidos a regime vacinal. Detecção por ELISA. O gráfico ilustra o resultado do pool de soros de cada grupo do ensaio II.

Não houve diferença significativa entre os soros gerados contra a OMV de *N. lactamica* e *N. meningitidis*. Oliver et. al., (2002) obteve resultados semelhantes ao imunizar camundongos com OMV de *N. lactamica* e observar reatividade cruzada com diversas cepas de *N. meningitidis*.

Em relação às vacinas de componentes proteicos podemos observar que a preparação que levou à maior concentração de anticorpos foi o complexo proteico 9, composto pela lipoproteína de competência, ComL e pela proteína de opacidade Opa/Opc. As proteínas 7 e 8, não apresentaram diferença significativa na indução de anticorpos contra a OMV de *N. meningitidis* entre si, resultado esperado levando em conta que as duas bandas são compostas da mesma proteína, a porinaB.

Esses dados corroboram para a possibilidade do uso de OMV de *N. lactamica* como antígeno vacinal.

4.7.2.2 Imunoblote

Figura 23 - Imunoblote. **A:** OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose. Reatividade do soro anti-proteína 7, P7 (linha 1), reatividade do soro anti-proteína 8, P8 (linha 2), reatividade do soro anti-complexo protéico 9, P9 (linha 3), reatividade do soro anti-OMV de *N. lactamica* (linha 4). **B:** OMV de *N. meningitidis* (cultivo do grupo A) imobilizada na membrana de nitrocelulose e reatividade do soro anti-OMV de *N. meningitidis* cultivada em MC2LAA (grupo A), e reatividade do soro anti-OMV de *N. meningitidis* cultivada em MC2LAA-YE (grupo B). **C:** OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose e reatividade dos soros anti-OMV de *N. meningitidis* (linha 1). OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose e reatividade dos soros anti-OMV de *N. lactamica* (linha 2). OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose, e reatividade dos soros anti-OMV de *N. lactamica* (linha 3). **D:** OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose e reatividade dos soros anti-proteína 7, P7 (linha 1), anti-proteína 8, P8 (linha 2) e anti-complexo protéico 9, P9 (linha 2) de *Neisseria lactamica*.

O pool dos soros se mostraram reativos. O soro anti-OMV de *N. lactamica* reage com 8 proteínas (figura 23 A, linha 4, bandas 1,2,3,4,7,8,9,10) de *N. lactamica* com massa molecular compatível com: a proteína App(1); a TbpA(2); a Omp85(3); a PilQ(4); duas bandas de PorB(7 e 8); a lipoproteína ComL(9); e Opa/Opc(10). O soro contra o complexo proteico 9 foi o único que reagiu com a proteína da banda 5, que é ou a proteína TbpB, proteína B de ligação à transferrina com 74,8 kDa ou a chaperona-60kDa. A banda 10, provavelmente a Opa/Opc, em torno de 27 kDa, não

foi observada no “ensaio vacinal I” no qual *N. lactamica* foi cultivada em agitador rotativo, em MC-YE (ensaio 1). Esta proteína foi observada em OMV obtida em cultivo descontínuo em biorreator em MC2LAA-YE, grupo C, talvez por se tratar de cultivo mais longo e tal proteína se expressar em maior quantidade.

O soro anti-OMV de *N. meningitidis* reage com 5 proteínas de *N. meningitidis* (figura 23B) com massa molecular compatíveis com: a proteína NadA ou App(1); a PorA(6); a PorB(8); a ComL(9) e Opa/Opc(10). Argumenta-se que a proteína de alto peso molecular é a NadA com base em dados anteriores obtidos no Laboratório e dados da literatura (COMANDUCCI et al., 2002; FUKASAWA et al., 2003). No entanto, com base em nossos dados decorrentes da análise de espectrometria de massas, foi identificada a App na OMV de *N. meningitidis*.

O soro anti-OMV de *N. lactamica* reage com 6 proteínas de *N. meningitidis* (figura 23 C linha 3) com massa molecular compatíveis com: a proteína App(1); a proteína Omp85(3); a proteína PilQ(4). A banda 6 está próxima à região da porina A de *N. meningitidis*. Conforme explicado anteriormente, na literatura é mencionado que *N. lactamica* não possui porina A, porém os dados de Vaughan et al. (2006) levam à hipótese de que essa proteína possa ser uma proteína hipotética de *N. lactamica* que reconhece a porina A de *N. meningitidis*; as bandas 7 e 8 correspondem à PorB de *N. lactamica* e reconhecem a PorB de *N. meningitidis*.

Os soros anti-proteína 7 e 8 reagiram com 2 proteínas (figura 23D linhas 1 e 2). As bandas 7 e 8 correspondem à proteína PorB de *N. lactamica* que reconhece a PorB de *N. meningitidis* com massa molecular predita de 33,0 kDa.

O soro anti-complexo proteico 9 de *N. lactamica* (figura 23D linha 3) reage de forma mais intensa com duas proteínas, banda 9 e 5 de *N. meningitidis*. Identificadas como a proteína ComL(9), e a banda 5 poderia ser ou a proteína B de ligação à transferrina, TbpB(5) com 71,6 kDa e/ou à chaperona-60kDa. O soro reage também com as proteínas Omp85(3) e PilQ(4).

Tabela 14– Esquematização da reatividade dos soros contra proteína 7, proteína 8, proteína 9 e OMV de *N. lactamica* contra a OMV de *N. lactamica* imobilizada em membrana de nitrocelulose.

Proteínas/ Soros	P7	P8	P9	OMV
(1) App	-	-	X	X
(2) TbpA	-	-	-	X
(3) Omp85	X	X	-	X
(4) PilQ	-	-	X	X
(5)Tbpb ou chaperona	-	-	X	-
(6) PorA	-	-	-	-
(7) PorB	X	X	-	X
(8) PorB	X	X	-	X
(9) ComL	-	-	X	X
(10)Opa/Opc	-	-	X	X

Tabela 15– Esquematização da reatividade dos soros contra OMV de *N. meningitidis* grupo A, OMV de *N. meningitidis* grupo B, proteína 7, proteína 8, proteína 9 e OMV de *N. lactamica* contra a OMV de *N. meningitidis* imobilizada em membrana de nitrocelulose

Soros Proteínas	Grupo A	Grupo B	P7	P8	P9	OMV de <i>N. lactamica</i>
(1) App	X	X	-	-	-	X
(2) TbpA	-	-	-	-	-	-
(3) Omp85	-	-	-	-	X	X
(4) PilQ	-	-	-	-	X	X
(5) TbpB ou chaperona	-	-	-	-	X	X
(6) PorA	X	X	-	-	-	X
(7) PorB	-	-	X	X	-	X
(8) PorB	-	X	X	X	-	X
(9) ComL	X	X	-	-	X	-
(10) Opa/Opc	X	X	-	-	-	-

Com base nos resultados dos imunoblotes e da espectrometria de massas, de todos os ensaios realizados, foram identificadas proteínas apresentadas na tabela 16. Tais resultados também foram fundamentados nos dados da literatura e apresentam dados inéditos sobre as principais proteínas responsáveis pela reatividade cruzada destas duas espécies de *Neisseria* (FINNEY et al., 2008; NCBI; (POLLARD e FRASCH, 2001; VAUGHAN et al., 2006; FINNEY et al., 2008). Características estruturais de algumas destas proteínas, disponíveis na literatura, estão apresentadas no item 4.7.3.

Tabela 16 – Proteínas de *Neisseria lactamica* e *N. meningitidis* identificadas por meio dos imunoblotes e espectrometria de massa nos diferentes ensaios realizados.

Proteína	<i>N. lactamica</i>		<i>N. meningitidis</i>	
	Gene Index	Massa molecular predita	Gene Index	Massa molecular predita
App – proteína de adesão e penetração	adhesion and penetration protein [Neisseria lactamica ATCC 23970] GI: 261401772	183,2 kDa	adhesion and penetration protein [Neisseria meningitidis MC58] GI: 15677813	159,9 kDa
TbpA – proteína A de ligação à transferrina	transferrin-binding protein A [Neisseria lactamica 020-06] GI: 313667844	101,9 kDa	transferrin-binding protein A [Neisseria meningitidis 053442] GI: 161870612	101,8 kDa
Omp85 – proteína de membrana externa 85	outer membrane protein Omp85 [Neisseria lactamica Y92-1009] GI:421863357	89,1 kDa	outer membrane protein OMP85 [Neisseria meningitidis FAM18] GI:121634057	88,4 kDa
PilQ – secretina pilQ	pilus secretin [Neisseria lactamica 020-06] GI:313669028	78,4 kDa	pilQ protein [Neisseria meningitidis MC58] GI: 15678016	82,4 kDa
TbpB – proteína B de ligação à transferrina	transferrin-binding protein B [Neisseria lactamica 020-06] GI: 313005305	74,8 kDa	transferrin binding protein B [Neisseria meningitidis serogroup B] GI: 9955715	71,6 kDa
PorA – porina A	-	-	class 1 outer membrane protein [Neisseria meningitidis] GI: 281336595	39,8 kDa
PorB – Porina B	major outer membrane protein P.IB [Neisseria lactamica ATCC 23970] GI: 269215308	34,5 kDa	class 3 outer membrane porin [Neisseria meningitidis] GI:1381240	33 kDa
ComL – proteína de lipocompetência	competence lipoprotein ComL [Neisseria lactamica ATCC 23970] GI: 261400384	30,6 kDa	competence lipoprotein [Neisseria meningitidis MC58] GI: 15676601	30,9 kDa
Opa/Opc – proteína de opacidade	opacity protein opA58 [Neisseria lactamica ATCC 23970] GI: 269214324	27 kDa	opacity protein [Neisseria meningitidis] GI: 2367645	26,2 kDa

4.7.3 Dados da literatura sobre as proteínas de interesse

4.7.3.1 App- Proteína de adesão e penetração

A proteína App pertence à família de auto-transportadores que são proteínas de bactérias gram-negativas caracterizadas por diferentes mecanismos de secreção. Proteínas desta família são fatores de virulência em diversas bactérias patogênicas (SERRUTO et al., 2003).

Auto-transportadores são sintetizados como proteínas precursoras podendo conter até três domínios funcionais: 1- uma sequência inicial N-terminal responsável pela exportação da proteína para o periplasma; 2- um domínio interno que pode ser clivado e liberado para o meio externo por um evento auto proteolítico ou pela atividade de protease do próprio domínio; e 3- um domínio C-terminal ou domínio β , inserido na membrana externa formando um poro em forma de barril β que permite a passagem do domínio interno. App possui os três domínios característicos, com um motivo conservado serino-protease (GDSGSP).

App faz a mediação da adesão com células Chang conjuntivais e a agregação bacteriana na superfície das células epiteliais. Uma vez sobre a superfície, App é clivada pela atividade de uma serino protease endógena e o domínio interno é libertado no sobrenadante do cultivo (SERRUTO et al., 2003).

Esta proteína encontrada na superfície da bactéria atua no processo de adesão e invasão. O soro obtido contra OMV de *N. lactamica* reage com a própria proteína App e com a App de *N. meningitidis*. Essas características

sugerem que esta proteína possui potencial vacinal. Não foram encontrados na literatura dados sobre o uso desta proteína como antígeno.

4.7.3.2 TbpA e TbpB – proteínas de ligação à transferrina

Neisseria não produz sideróforos, mas extrai ferro diretamente da transferrina presente no soro humano. O sistema de transporte de ferro em *Neisseria* consiste em duas grandes proteínas de superfície, a TbpA e a TbpB (PERKINS-BALDING, RATLIFF-GRIFFIN e STOJILJKOVIC, 2004).

A proteína A de ligação à transferrina (TbpA, ou Tbp1), com aproximadamente 100 kDa, está presente na membrana externa e pertence à família de transportadores TonB dependente. Ela atua como um poro pelo qual o íon ferro ou o heme é diretamente transportado.

A proteína B de ligação à transferrina (TbpB ou Tbp2) é um receptor lipomodificado, inteiramente exposto na superfície, com aproximadamente 80 kDa. TbpA e TbpB, são encontradas em todos os isolados clínicos de *Neisseria* patogênicas (NOINAJ, BUCHANAN e CORNELISSEN, 2012).

A sequência de TbpA é altamente conservada entre as cepas patogênicas de *Neisseria*. TbpB é mais variável, mas nenhuma das proteínas é caracterizada como altamente variável. O soro obtido com OMV de *N. lactamica* reconhece a própria proteína TbpA, e pode reconhecer a TbpA e TbpB de *N. meningitidis*. Essas características fazem de ambas, importantes alvos vacinais (KHUN, KIRBY e LEE, 1998; PERKINS-BALDING, RATLIFF-

GRIFFIN e STOJILJKOVIC, 2004; NOINAJ, BUCHANAN e CORNELISSEN, 2012).

4.7.3.3 Omp85 – proteína de membrana externa 85

A proteína Omp85 é composta de um domínio de membrana C-terminal em forma de barril β tubular com 16 segmentos com seis alças expostas na superfície e um domínio periplasmático N-terminal. Proteínas homólogas à Omp85 estão presentes em todas as bactérias gram-negativas, em cloroplastos e em mitocôndrias (WEDEGE et al., 2013).

A proteína Omp85 é um dos principais componentes para a inserção de componentes na membrana externa. A Omp85 é necessária para o transporte de LPS e de fosfolípídeo para a membrana externa. O transporte de LPS para a membrana envolve duas etapas: inicialmente com o transporte das moléculas do periplasma para a parte interna da membrana e em seguida para a superfície da membrana externa (VOULHOX e TOMMASSEN, 2004).

Wedeg, et al. (2013) imunizaram camundongos de diferentes linhagens com OMV nativas e OMV modificadas para superexpressar a proteína Omp85. Ao analisarem os ensaios de atividade bactericida e de opsonização, foi observado que o aumento na expressão da proteína Omp85 levou ao aumento no título de anticorpos, mas esses anticorpos não estão relacionados com a proteção contra a doença meningocócica, pois não contribuíram para a atividade bactericida ou opsonizante do soro. Sendo assim, a proteína Omp85 isolada não seria um antígeno promissor para a formulação de uma vacina contra a meningite meningocócica.

4.7.3.4 PilQ –secretina do pilus tipo IV

A secretina PilQ é um componente chave da maquinaria de secreção do pilus do tipo IV de diversos agentes patogênicos gram-negativos. A presença do pilus do tipo IV é um pré-requisito para a adesão de *N. meningitidis* à superfície de mucosa da nasofaringe de humanos. O pilus provém da superfície bacteriana e faz a intermediação da ligação com receptores de tecidos epiteliais específicos durante a colonização. Além de seu papel na colonização, está envolvido em vários outros processos biológicos, incluindo a auto aglutinação bacteriana, mobilidade por “twitching” e competência para a incorporação de DNA (COLLINS et al., 2001).

A biogênese do pilus tipo IV de *Neisseria* exige complexas interações de 15 proteínas. Dentre estas proteínas encontra-se a proteína PilQ. Esta proteína, em *Neisseria* patogênicas, é conservada e está presente em grandes quantidades na membrana externa. PilQ forma uma estrutura simétrica de aproximadamente 900 kDa composta de 12 subunidades idênticas (figura 24 – 1). Mutantes que expressam formas defeituosas desta proteína ou não a expressam, não apresentam pili. O monômero de PilQ de *N. meningitidis* tem uma região polimórfica em sua porção N-terminal (figura 24 – 2) (COLLINS et al., 2001; COLLINS et al., 2004; FRYE et al., 2006; BERRY et al., 2012).

Figura 24 – Estrutura tridimensional determinada por cristalografia da proteína 4AR0 ou PilQ de *Neisseria meningitidis*. 1- dodecamero ; 2- monômero

Fonte: (BERRY et al., 2012)

O soro contra OMV de *N. lactamica* se mostrou reativo com a própria PilQ e com a PilQ de *N. meningitidis*. A secretina PilQ é um potencial candidato vacinal, devido à sua abundância na membrana externa de *N. meningitidis*. Diferentemente de outras bactérias gram-negativas, *N. meningitidis* possui somente esta secretina, em níveis muito elevados (COLLINS et al., 2001; COLLINS et al., 2004; FRYE et al., 2006; BERRY et al., 2012).

4.7.3.5 Porinas

Porinas são proteínas integrantes da membrana externa que formam canais de difusão aquosos que funcionam como filtros moleculares em bactérias gram-negativas. As porinas fazem a mediação da difusão aquosa de solutos polares essenciais entre a bactéria e o seu ambiente circundante (MINETTI et al., 1997; KATTNER et al., 2013).

Porinas de *Neisseria* pertencem à superfamília de porinas gram-negativas. São as proteínas da membrana externa presentes em maior quantidade nas espécies de *Neisseria* patogênicas. As porinas de *N. meningitidis* foram denominadas de proteína de classe 1 ou PorA, de aproximadamente 45 kDa, e proteína de classe 2 ou classe 3 ou PorB de aproximadamente 33 kDa (MASSARI et al., 2003).

As porinas de *Neisseria* possuem estrutura nativa trimérica, com cada porina compreendendo três polipeptídeos. Cada polipeptídeo contém uma proporção elevada de folhas β pregueadas, que confere um motivo estrutural de barril β pregueado para a molécula nativa trimérica (MASSARI et al., 2003).

4.7.3.6 PorA – Porina A

Porina A, PorA ou proteína de classe 1, forma poros triméricos catiônicos na membrana externa de *N. meningitidis* e possui de 44 a 47 kDa (POLLARD e FRASCH, 2001; HAGHI et al., 2011). PorA é expressa em quase todos os isolados meningocócicos, embora haja uma considerável variação no seu nível de expressão (VAN DER LEY et al., 1991; MASSARI et al., 2003).

Esta proteína transmembrânica consiste de uma cadeia de barril β tubular de 16 segmentos, com oito alças longas expostas na superfície (I-VIII). A maior variabilidade ocorre nas regiões variáveis 1 e 2 (VR1 e VR2), que correspondem às alças I e IV.

A diversidade antigênica entre os diversos tipos de porina A forma a base para a consideração de diferentes subtipos de *N. meningitidis* (HAGHI et

al., 2011). A PorA é designada com o prefixo “P1” seguido dos números, separados por vírgulas que correspondem à designação do subtipo.

Russell et al., (2004) propuseram uma revisão na nomenclatura, compatível com a nomenclatura sorológica anterior. Foi criado um banco de dados (<http://neisseria.org/nm/typing/pora>) no qual é possível encontrar a descrição da nova nomenclatura e a relação com os métodos utilizados anteriormente.

Durante a última década, as vacinas mono e multivalentes baseadas na porina A foram desenvolvidas e avaliadas. Estas vacinas têm como base os sorosubtipos predominantes em áreas geográficas distintas devido à alta variabilidade antigênica desta proteína (POLLARD e FRASCH, 2001; CLARKE et al., 2003; HAGHI et al., 2011).

As porinas de *Neisseria* induzem resposta de anticorpos durante a infecção correlacionada com o desenvolvimento de atividade bactericida e opsonizante. Esta atividade parece estar relacionada principalmente com a porina A (WRIGHT et al., 2002).

Os resultados obtidos nos imunoblotes demonstram que o soro produzido com as OMVs de *N. lactamica* reconhece uma proteína na altura da porina A de *N. meningitidis*, indicando a presença de uma proteína similar a porina A em *N. lactamica* assim como observado por Vaughan et. al., (2006).

4.7.3.7 *PorB - Porina B*

Porina B, (PorB) é a segunda proteína de membrana externa, em termos de prevalência, em *N. meningitidis*. O monômero da PorB consiste de barril β tubular de 16 segmentos com 8 segmentos curtos na região periplasmática e 8 alças longas (L1–L8) na região extracelular (figura 25 – 1 e 2). Três vias distintas de translocação parecem ser alojadas dentro do mesmo poro: um seletivo para açúcares, uma para cátions, e uma para ânions. Os cátions passam ao lado de um conjunto de resíduos ácidos, sobre um lado da zona de constrição do canal, enquanto ânions atravessam o poro perto de um aglomerado de resíduos básicos no lado oposto da parede do cilindro. A possível via de translocação de cátions e ânions não se sobrepõem com o sítio de ligação de açúcares, sugerindo que o transporte seletivo de açúcar e o transporte seletivo de cátion e ânion através da PorB são independentes (MINETTI et al., 1997; MASSARI, HO e WETZLER, 2000; KATTNER et al., 2013).

Figura 25 – Estrutura tridimensional determinada por cristalografia da proteína 3VY9 ou PorB de *Neisseria meningitidis* complexada com íon cério. 1- trímero; 2- monômero

Fonte: (KATTNER et al., 2013)

As coordenadas e os fatores estruturais para PorB estão depositados no Protein Data Bank RCSB com os códigos de acesso: 3VY8 (P63) e 3VY9 (R32) (KATTNER et al., 2013).

PorB é reconhecida pelo hospedeiro como um padrão molecular patógeno-associado (PAMP), ativando a resposta imune por meio de ligação específica para o receptor semelhante a toll tipo 2 (TLR2) em um heterocomplexo com o receptor semelhante a toll do tipo 1 (TLR1) que atua possivelmente como correceptor na interação com PorB (MASSARI et al., 2006; KATTNER et al., 2013).

Além de atuar como PAMP, PorB pode interagir com a mitocôndria do hospedeiro, desempenhando um papel importante na patogenicidade da bactéria. Massari, Ho e Wetzler, (2000), demonstraram que a interação de células de mamíferos e porinas de *Neisseria* “in vitro” envolvem a translocação intracelular da porina, seguido de inserção no compartimento mitocondrial e interação com o canal dependente da voltagem ânion mitocondrial do hospedeiro (VDAC). Uma vez inserida, poros ATP-regulados são formados, levando à dissipação do potencial da membrana e a perda da estrutura em cristas afetando as mitocôndrias, podendo levar a apoptose (KOZJAK-PAVLOVIC et al., 2009).

A interação de PorB meningocócica com a superfície da célula parece ter dois componentes. Uma interação não específica com a inserção direta da porina, na sua forma nativa trimérica, na membrana da mitocôndria da célula, e uma interação específica mediada pela ligação a TLR2 na superfície da célula

(MINETTI et al., 1997; MASSARI, HO e WETZLER, 2000; MASSARI et al., 2006; KATTNER et al., 2013).

O gene *porB* possui dois alelos que codificam as proteínas responsáveis pela determinação do sorotipo, as proteínas de classe 2 (PorB2) ou classe 3 (PorB3), sendo a expressão mutuamente exclusiva (WRIGHT et al., 2002).

Ao longo dos cultivos de *N. lactamica* (tabela 4, grupo C, pág. 20), uma banda de aproximadamente 37 kDa (figura 17) se torna mais intensa com o passar das horas. Essa banda foi analisada por espectrometria de massas e identificada como sendo a porina B, assim como a banda acima. O soro produzido com as OMVs de *N. lactamica* reconhece as próprias proteínas PorB, assim como a PorB de *N. meningitidis*. O soro obtido com as proteínas 7 e 8, reconhecem duas proteínas de *N. meningitidis*.

4.7.3.8 ComL – Proteína de lipocompetência

ComL, a proteína de lipocompetência está envolvida no processo de transformação bacteriana (FUSSENEGGER et al., 1997; VOLOKHINA et al., 2009; BENAM et al., 2011).

A transformação em bactérias é um processo complexo envolvendo absorção de DNA exógeno seguido pela recombinação homóloga deste DNA ao cromossomo bacteriano. *N. meningitidis* é naturalmente competente para a transformação, sendo essa a via predominante para a troca de DNA cromossômico entre cepas de *Neisseria* (BENAM et al., 2011).

Em *N. meningitidis* a absorção de DNA exógeno durante a transformação requer a presença de sequências específicas de 12 bp no DNA

exógeno, além da expressão de diversos componentes relacionados ao pili e fatores de competência, incluindo as proteínas PilQ, ComE, ComA e a lipoproteína de competência, a ComL (BENAM et al., 2011; MARQUES, 2012). O genoma de *N. meningitidis*, *N. lactamica* e *N. gonorrhoeae* possuem várias repetições desta sequência espalhada em seu cromossomo (BENAM et al., 2011; MARQUES, 2012).

Fussenegger et al., (1997) propõem que ComL, em *N. gonorrhoeae* pode atuar diretamente ou indirectamente na clivagem transitória da camada de mureína, a fim de abrir a barreira de peptidoglicano para a entrada de DNA.

Proteínas ortólogas de ComL são conservadas entre as espécies de bactérias gram-negativas e outras *Neisseria*. O soro contra as OMVs de *N. lactamica* se mostrou reativo com a própria ComL e com a ComL de *N. meningitidis*. Essas características indicam que essa proteína é um interessante antígeno vacinal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou uma análise comparativa da cinética de cultivo em biorreator de *N. meningitidis* com *N. lactamica* em meio de Catlin modificado com adição do extrato de levedura, e a comparação de *N. meningitidis*, entre si, em dois meios de cultivo, o meio definido de Catlin modificado e neste mesmo meio com adição de extrato de levedura. Foram realizados estudos da antigenicidade e reatividade cruzada de OMV de ambas as espécies e das proteínas presentes na OMV de *N. lactamica* e análise destas por espectrometria de massas enriquecendo o conhecimento da biologia destes microrganismos.

As análises realizadas neste trabalho possibilitaram uma nova discussão sobre o metabolismo e sobre a produtividade de OMVs destas bactérias. Apesar de existirem trabalhos na literatura sobre o metabolismo de *Neisserias*, poucas informações são encontradas sobre a cinética de cultivo em biorreator. Vale ressaltar que apesar deste trabalho reproduzir as melhores condições de cultivo, desenvolvidas anteriormente no laboratório de Bioprocessos, foram obtidos dados inéditos quanto ao metabolismo e à produtividade de OMV destas bactérias, em especial no grupo B, no qual *N. meningitidis* foi cultivada em um meio nunca utilizado para o cultivo deste organismo.

Quanto à produtividade e a concentração máxima de OMV, *N. lactamica* (grupo C) obteve valores de 0,32 g/L.h e de 152mg/L respectivamente. Valores 2,5 vezes maiores de produtividade e 5 vezes maiores de rendimento do que

os obtido para *N. meningitidis*, de 30mg/L e 0,13 g/L.h respectivamente, nas mesmas condições e tempo de cultivo.

As análises realizadas com OMV de *N. lactamica* e *N. meningitidis* demonstraram que, nas condições estudadas, o diâmetro e a carga diferem entre si, sendo que a OMV de *N. meningitidis* tem carga negativa e diâmetro de 141,4nm e a OMV de *N. lactamica* tem carga neutra e diâmetro de 110,7nm, sendo estas características vantajosas para o desenvolvimento de vacinas por diminuir a interação inespecífica com diferentes células .

A porina B de *N. lactamica* aparece no gel de eletroforese em duas bandas, que se tornam mais intensas ao longo do cultivo. Essas proteínas foram utilizadas para imunizar os animais. Os soros obtidos se mostraram reativos com a porina B de *N. meningitidis*.

Por espectrometria de massa, foram identificadas 229 proteínas na OMV de *N. lactamica*, sendo 77 proteínas de membrana e 243 proteínas de *N. meningitidis*, sendo 54 proteínas de membrana.

Os ensaios de imunoblote e ELISA demonstraram que os soros gerados contra as proteínas isoladas PorB, Opa/Opc, e ComL de *N. lactamica* foram reativos com proteínas de *N. meningitidis*, assim como o soro anti-OMV de *N. lactamica* que reagiu com 6 proteínas de *N. meningitidis*, as proteínas App, Omp85, PilQ, TbpB, PorA e PorB.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a possibilidade do uso de OMV de *Neisseria lactamica* como antígeno na produção de uma vacina contra a doença meningocócica causada por *Neisseria meningitidis*. Uma vacina

desenvolvida com antígenos proteicos de *N. lactamica* tem o potencial de conferir proteção contra os diferentes sorogrupos de *N. meningitidis* já que não devido à ausência de capsula e da proteína PorA a resposta não seria nem sorotipo nem sorogrupo específica.

6 CONCLUSÃO

- Quanto à produtividade e a concentração máxima de OMV, *N. lactamica* (grupo C) obteve valores de 0,32 g/L.h e de 152mg/L respectivamente. Valores 2,5 vezes maiores de produtividade e 5 vezes maiores de rendimento do que os obtido para *N. meningitidis*, de 30mg/L e 0,13 g/L.h respectivamente, nas mesmas condições e tempo de cultivo.
- As análises de espectrometria de massas forneceram dados inéditos sobre a composição proteica das vesículas de membrana externa – OMV de *N. lactamica* N.799/98 e *N. meningitidis* N.44/89 possibilitando a identificação das proteínas envolvidas nas reações de reatividade cruzada entre esses organismos.
- Uma vacina desenvolvida com antígenos proteicos de *N. lactamica* tem o potencial de conferir proteção contra os diferentes sorogrupos de *N. meningitidis* já que devido à ausência de cápsula e da proteína PorA a resposta não seria nem sorotipo nem sorogrupo específica.
- Os resultados obtidos neste trabalho indicam a possibilidade do uso de OMV de *Neisseria lactamica* como antígeno na produção de uma vacina contra a doença meningocócica causada por *Neisseria meningitidis*.

REFERENCIAS*

Anjum, M. F. et al. Nitric oxide metabolism in *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol**, v. 184, n. 11, p. 2987-93, Jun 2002. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003939> >.

Baart, G. J. et al. Modeling *Neisseria meningitidis* B metabolism at different specific growth rates. **Biotechnol Bioeng**, v. 101, n. 5, p. 1022-35, Dec 2008. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942773> >.

Baart, G. J. et al. Modeling *Neisseria meningitidis* metabolism: from genome to metabolic fluxes. **Genome Biol**, v. 8, n. 7, p. R136, 2007. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617894> >.

Baruque-Ramos, J. et al. Accumulation of organic acids in cultivations of *Neisseria meningitidis* C. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 10, p. 869-77, Oct 2006. ISSN 1367-5435. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736170> >.

Benam, A. V. et al. Structure-function relationships of the competence lipoprotein ComL and SSB in meningococcal transformation. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 5, p. 1329-42, May 2011. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330432> >.

Bennett, J. S. et al. Genetic diversity and carriage dynamics of *Neisseria lactamica* in infants. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2424-32, Apr 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784588> >.

Berry, J. L. et al. Structure and assembly of a trans-periplasmic channel for type IV pili in *Neisseria meningitidis*. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 9, p. e1002923, Sep 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028322> >.

Beveridge, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **J Bacteriol**, v. 181, n. 16, p. 4725-33, Aug 1999. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438737> >.

Budroni, S. et al. *Neisseria meningitidis* is structured in clades associated with restriction modification systems that modulate homologous recombination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 11, p. 4494-9, Mar 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368196> >.

Clarke, S. C. et al. Analysis of PorA variable region 3 in meningococci: implications for vaccine policy? **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2468-73, Jun 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12744880> >.

Collins, R. F. et al. Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. **J Bacteriol**, v. 183, n. 13, p. 3825-32, Jul 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395444> >.

Collins, R. F. et al. Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. **J Biol Chem**, v. 279, n. 38, p. 39750-6, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254043> >.

Comanducci, M. et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. **J Exp Med**, v. 195, n. 11, p. 1445-54, Jun 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045242> >.

Coureuril, M. et al. Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 164-72, 2012 Mar-Apr 2012. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366962> >.

Devoe, I. W.; Gilchrist, J. E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. **J Exp Med**, v. 138, n. 5, p. 1156-67, Nov 1973. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4200775> >.

E., F. C. Meningococcal vaccines: past, present and future. In: (Ed.). **Meningococcal disease**. Chichester: J Wiley, 1995. p.260-283.

Ellis, T. N.; Kuehn, M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 1, p. 81-94, Mar 2010. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20197500> >.

Findlow, J. et al. Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant Meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 10, p. 1127-37, Nov 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20954968> >.

Finney, M. et al. Characterization of the key antigenic components and pre-clinical immune responses to a meningococcal disease vaccine based on

Neisseria lactamica outer membrane vesicles. **Hum Vaccin**, v. 4, n. 1, p. 23-30, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 1554-8619. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921703> >.

Foged, C. et al. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **Int J Pharm**, v. 298, n. 2, p. 315-22, Jul 2005. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961266> >.

Frye, S. A. et al. Topology of the outer-membrane secretin PilQ from Neisseria meningitidis. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 12, p. 3751-64, Dec 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159226> >.

Fu, J. et al. Recent advances in the large scale fermentation of Neisseria meningitidis group B for the production of an outer membrane protein complex. **Biotechnology (N Y)**, v. 13, n. 2, p. 170-4, Feb 1995. ISSN 0733-222X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634759> >.

Fukasawa, L. O. et al. Immune response to native NadA from Neisseria meningitidis and its expression in clinical isolates in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 2, p. 121-5, Feb 2003. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543917> >.

Fussenegger, M. et al. Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in Neisseria gonorrhoeae--a review. **Gene**, v. 192, n. 1, p. 125-34, Jun 1997. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224882> >.

Gold, R. et al. Carriage of Neisseria meningitidis and Neisseria lactamica in infants and children. **J Infect Dis**, v. 137, n. 2, p. 112-21, Feb 1978. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/415097> >.

GONÇALVES, B. I. **Cinética do cultivo de *N. lactamica* em biorreator. 155 f. Dissertação.** 2012. 155 (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo.

Gorringe, A. et al. The development of a meningococcal disease vaccine based on Neisseria lactamica outer membrane vesicles. **Vaccine**, v. 23, n. 17-18, p. 2210-3, Mar 2005. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755597> >.

Gorringe, A. R. et al. Phase I safety and immunogenicity study of a candidate meningococcal disease vaccine based on Neisseria lactamica outer membrane

vesicles. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 8, p. 1113-20, Aug 2009. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553555> >.

Haghi, F. et al. Cloning, expression and purification of outer membrane protein PorA of *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J Infect Dev Ctries**, v. 5, n. 12, p. 856-62, Dec 2011. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169784> >.

Hollis, D. G.; Wiggins, G. L.; Weaver, R. E. *Neisseria lactamica* sp. n., a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. **Appl Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 71-7, Jan 1969. ISSN 0003-6919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4975454> >.

Kattner, C. et al. Identification of a cation transport pathway in *Neisseria meningitidis* PorB. **Proteins**, v. 81, n. 5, p. 830-40, May 2013. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23255122> >.

Khun, H. H.; Kirby, S. D.; Lee, B. C. A *Neisseria meningitidis* fbpABC mutant is incapable of using nonheme iron for growth. **Infect Immun**, v. 66, n. 5, p. 2330-6, May 1998. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573125> >.

Kozjak-Pavlovic, V. et al. Bacterial porin disrupts mitochondrial membrane potential and sensitizes host cells to apoptosis. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 10, p. e1000629, Oct 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851451> >.

Lewis, L. A.; Ram, S. Meningococcal disease and the complement system. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 98-126, Jan 2014. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24104403> >.

Li, Y. et al. Immunization with live *Neisseria lactamica* protects mice against meningococcal challenge and can elicit serum bactericidal antibodies. **Infect Immun**, v. 74, n. 11, p. 6348-55, Nov 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966413> >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

Maiden, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 6, p. 3140-5, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501229> >.

Marques, M. d. V. **Biologia molecular e genética bacteriana**. Riberão Preto, São Paulo, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348 ISBN 978-85-89265-16-4.

Mashburn-Warren, L.; McLean, R. J.; Whiteley, M. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. **Geobiology**, v. 6, n. 3, p. 214-9, Jun 2008. ISSN 1472-4669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18459967> >.

Massari, P.; Ho, Y.; Wetzler, L. M. Neisseria meningitidis porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 9070-5, Aug 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922061> >.

Massari, P. et al. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 87-93, Feb 2003. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12598131> >.

Massari, P. et al. Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling. **J Immunol**, v. 176, n. 4, p. 2373-80, Feb 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16455995> >.

Minetti, C. A. et al. Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from Neisseria meningitidis. Conformational stability and porin activity. **J Biol Chem**, v. 272, n. 16, p. 10710-20, Apr 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099721> >.

Morley, S. L.; Pollard, A. J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? **Vaccine**, v. 20, n. 5-6, p. 666-87, Dec 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738731> >.

Müller, H.; Hinton, J. A. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**, v. 48, p. 330, 1941.

Noinaj, N.; Buchanan, S. K.; Cornelissen, C. N. The transferrin-iron import system from pathogenic Neisseria species. **Mol Microbiol**, v. 86, n. 2, p. 246-57, Oct 2012. ISSN 1365-2958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957710> >.

Oliver, K. J. et al. Neisseria lactamica protects against experimental meningococcal infection. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3621-6, Jul 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065503> >.

Panatto, D. et al. Neisseria meningitidis B vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 10, n. 9, p. 1337-51, Sep 2011. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21919622> >.

Perkins-Balding, D.; Ratliff-Griffin, M.; Stojilkovic, I. Iron transport systems in Neisseria meningitidis. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 1, p. 154-71, Mar 2004. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15007100> >.

Pettersson, A. et al. Vaccine potential of the Neisseria meningitidis lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB. **Vaccine**, v. 24, n. 17, p. 3545-57, Apr 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517031> >.

Piet, J. R. et al. Genome sequence of Neisseria meningitidis serogroup B strain H44/76. **J Bacteriol**, v. 193, n. 9, p. 2371-2, May 2011. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21378179> >.

Pizza, M.; Rappuoli, R. Neisseria meningitidis: pathogenesis and immunity. **Curr Opin Microbiol**, v. 23C, p. 68-72, Nov 2014. ISSN 1879-0364. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461575> >.

Pizza, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-20, Mar 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710308> >.

Pollard, A. J.; Frasch, C. Development of natural immunity to Neisseria meningitidis. **Vaccine**, v. 19, n. 11-12, p. 1327-46, Jan 2001. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163654> >.

Poolman, J. T. Development of a meningococcal vaccine. **Infect Agents Dis**, v. 4, n. 1, p. 13-28, Mar 1995. ISSN 1056-2044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728353> >.

Requejo, H. I. Z. **A Meningite Meningocócica no Mundo** Dois séculos da Histórias das Epidemias são Paulo: Edições Inteligentes, 2005. 271 ISBN 85-7615-086-7.

Richmond, P. C. et al. Safety, immunogenicity, and tolerability of meningococcal serogroup B bivalent recombinant lipoprotein 2086 vaccine in healthy adolescents: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 2

trial. **Lancet Infect Dis**, v. 12, n. 8, p. 597-607, Aug 2012. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569484> >.

Russell, J. E. et al. PorA variable regions of Neisseria meningitidis. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 674-8, Apr 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200858> >.

Sadarangani, M.; Pollard, A. J. Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 2, p. 112-24, Feb 2010. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113980> >.

SAFADI, M. A. P.; BEREZIN, E. N.; OSELKA, G. W. **Análise crítica das recomendações do uso das vacinas meningocócicas conjugadas: *Jornal de Pediatria (Rio J.)***. vol.88: 195-202 p. 2012.

Santolaya, M. E. et al. Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 617-24, Feb 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260988> >.

Santos, S. et al. Outer membrane vesicles (OMV) production of Neisseria meningitidis serogroup B in batch process. **Vaccine**, v. 30, n. 42, p. 6064-9, Sep 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867717> >.

Sardiñas, G. et al. Outer membrane vesicles of Neisseria lactamica as a potential mucosal adjuvant. **Vaccine**, v. 24, n. 2, p. 206-14, Jan 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115701> >.

Schoen, C. et al. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in Neisseria meningitidis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 9, p. 3473-8, Mar 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305155> >.

Schoen, C. et al. Metabolism and virulence in Neisseria meningitidis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, p. 114, 2014. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25191646> >.

Serruto, D. et al. Neisseria meningitidis App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 323-34, Apr 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675794> >.

SINAN. **TABULAÇÃO DE DADOS**. Saúde, M. d. e Notificação, S. d. I. d. A. d. sinanweb: Ministério da Saúde 2013.

Smith, H.; Tang, C. M.; Exley, R. M. Effect of host lactate on gonococci and meningococci: new concepts on the role of metabolites in pathogenicity. **Infect Immun**, v. 75, n. 9, p. 4190-8, Sep 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562766> >.

Tan, L. K.; Carlone, G. M.; Borrow, R. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. **N Engl J Med**, v. 362, n. 16, p. 1511-20, Apr 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410516> >.

Tettelin, H. et al. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1809-15, Mar 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710307> >.

Tsolakos, N. et al. Characterization of meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines from strain 44/76 after growth in different media. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3211-8, Apr 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188677> >.

van de Waterbeemd, B. et al. Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. **Vaccine**, v. 28, n. 30, p. 4810-6, Jul 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483197> >.

van de Waterbeemd, B. et al. Identification and optimization of critical process parameters for the production of NOMV vaccine against *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 30, n. 24, p. 3683-90, May 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464965> >.

van de Waterbeemd, B. et al. Cysteine depletion causes oxidative stress and triggers outer membrane vesicle release by *Neisseria meningitidis*; implications for vaccine development. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54314, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372704> >.

van der Ley, P. et al. Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. **Infect Immun**, v. 59, n. 9, p. 2963-71, Sep 1991. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1652557> >.

van Deuren, M.; Brandtzaeg, P.; van der Meer, J. W. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. **Clin**

Microbiol Rev, v. 13, n. 1, p. 144-66, table of contents, Jan 2000. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627495> >.

Vaughan, T. E. et al. Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. **Vaccine**, v. 24, n. 25, p. 5277-93, Jun 2006. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682101> >.

Volokhina, E. B. et al. The beta-barrel outer membrane protein assembly complex of *Neisseria meningitidis*. **J Bacteriol**, v. 191, n. 22, p. 7074-85, Nov 2009. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767435> >.

Voulhoux, R.; Tommassen, J. Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. **Res Microbiol**, v. 155, n. 3, p. 129-35, Apr 2004. ISSN 0923-2508. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143770> >.

Wedeg, E. et al. Meningococcal omp85 in detergent-extracted outer membrane vesicle vaccines induces high levels of non-functional antibodies in mice. **Scand J Immunol**, v. 77, n. 6, p. 452-9, Jun 2013. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23521186> >.

Wright, J. C. et al. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 4028-34, Aug 2002. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117908> >.

Zollinger, W. D.; Moran, E. Meningococcal vaccines--present and future. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 85 Suppl 1, p. 37-43, 1991. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1803695> >.

ANEXOS

Anexo 1 – Meios de cultura

Componentes	Formula molecular	Meio Catlin g/L	MC2LAA g/L	MC2LAA-YE g/L
Cloreto de sódio	NaCl	5,844	5,844	5,844
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	0,401	0,401	0,401
Cloreto de potássio	KCl	0,186	0,186	0,186
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,037	0,037	0,037
Citrato de sódio	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	0,647	0,647	0,647
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,616	0,616	0,616
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	0,001	0,001	0,001
Ácido L-glutâmico	C ₅ H ₉ NO ₄	1,180	2,36	2,36
L-arginina.HCl	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ .HCl	0,105	0,21	0,21
Glicina	NH ₂ CH ₂ COOH	0,151	0,302	0,302
L-serina	C ₃ H ₇ NO ₃	0,021	0,042	0,042
L-cisteína.HCl.H ₂ O	C ₃ H ₇ NO ₂ S.HCl.H ₂ O	0,011	0,022	0,022
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₆	5 ml	5ml	5ml
Lactato de Sódio	NaC ₃ H ₅ O ₃	7,01	15,02	15,02
Fosfato de Sódio	Na ₂ HPO ₄	1,062	1,062	1,062
Fosfato de Potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	0,171	0,171	0,171
Extrato de levedura ultrafiltrado	-	-	-	2,00

Anexo 2 – Resultados experimentais do Grupo A, ensaio 2 - *Neisseria meningitidis* em MC2LAA.

Tempo (H)	DO _{540nm}	Massa seca	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,17	0,08	0,65	14,79	0,31	0,63	0,05	0,10	0,12
1	0,40	0,19	0,86	14,15	0,38	0,54	0,17	0,09	0,10
2	0,90	0,42	2,08	13,70	0,84	1,50	3,68	0,47	0,09
3	1,52	0,70	1,77	12,14	0,85	1,62	3,67	0,46	0,11
4	1,46	0,67	5,39	10,41	0,95	5,92	7,78	1,03	0,11
5	1,49	0,68	9,27	8,70	1,24	8,44	8,64	1,83	0,10
6	1,49	0,68	10,83	7,33	1,32	9,40	11,73	2,19	0,11
7	1,47	0,67	11,46	6,30	1,16	7,09	7,63	2,50	0,11
8	1,45	0,67	15,42	5,18	2,36	14,53	13,32	3,76	0,10
9	1,55	0,71	15,10	4,38	2,14	10,26	11,62	3,93	0,10
10	1,49	0,69	18,44	3,59	2,29	9,76	9,17	4,15	0,12
11	1,32	0,61	25,00	2,07	2,50	7,18	7,72	3,36	0,11
12	1,28	0,59	29,90	2,22	2,72	8,61	9,01	4,17	0,11

Anexo 3– Resultados experimentais do Grupo A, ensaio 3 - *Neisseria meningitidis* em MC2LAA.

Tempo (H)	DO 540nm	Massa seca	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,17	0,08	1,22	15,32	0,30	0,59	0,06	0,09	0,11
1	0,32	0,15	2,53	13,98	0,36	0,55	0,12	0,09	0,11
2	0,75	0,35	2,71	12,02	0,54	0,54	0,84	0,09	0,09
3	1,53	0,70	3,36	11,96	0,84	0,68	2,05	0,07	0,10
4	1,60	0,74	7,81	9,47	1,08	3,56	5,50	0,68	0,10
5	1,57	0,72	11,15	8,27	1,31	5,18	6,87	0,92	0,09
6	1,65	0,76	9,84	6,24	1,54	5,46	8,21	1,18	0,10
7	1,62	0,75	12,24	3,67	1,86	5,82	7,58	1,56	0,09
8	1,67	0,77	19,90	5,59	2,04	5,27	7,64	1,70	0,08
9	1,66	0,76	20,52	2,51	2,36	5,81	7,86	1,97	0,11
10	1,59	0,73	23,65	1,59	2,55	6,05	11,05	1,64	0,09
11	1,50	0,69	26,46	1,43	2,51	5,93	6,57	2,68	0,09
12	1,48	0,68	40,21	0,97	2,90	4,66	6,00	2,10	0,09

Anexo 4 – Resultados experimentais do Grupo B, ensaio 4. *Neisseria meningitidis* em MC2LAA-YE

Tempo (H)	DO _{540nm}	Massa seca	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,18	0,08	1,17	14,54	0,37	0,60	0,16	0,19	0,08
1	0,49	0,23	1,41	14,34	0,85	0,57	0,78	0,18	0,08
2	1,24	0,57	3,75	13,36	0,68	0,49	3,39	0,18	0,10
3	2,42	1,11	4,48	11,61	1,18	0,27	3,63	0,19	0,07
4	2,87	1,32	6,76	10,73	1,77	0,12	0,16	0,21	0,10
5	2,83	1,30	9,48	9,80	1,98	0,00	0,05	0,22	0,09
6	2,97	1,36	23,93	9,87	2,33	0,00	0,04	0,21	0,12
7	3,02	1,39	16,58	9,71	2,64	0,00	0,05	0,00	0,14
8	2,98	1,37	16,94	9,40	2,57	0,00	0,05	0,00	0,16
9	3,06	1,41	23,44	9,25	2,87	0,00	0,05	0,00	0,18
10	3,23	1,48	23,96	8,70	3,07	0,00	0,04	0,00	0,18
11	3,36	1,55	30,38	8,06	3,38	0,00	0,04	0,00	0,18
12	3,48	1,60	27,78	7,09	3,51	0,00	0,04	0,00	0,19

Anexo 5 – Resultados experimentais do Grupo B, ensaio 5. *Neisseria meningitidis* em MC2LAA-YE

Tempo (H)	DO _{540nm}	Massa seca	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,18	0,08	1,17	14,61	0,37	0,61	0,17	0,20	0,08
1	0,49	0,23	1,64	14,65	0,87	0,58	0,75	0,19	0,06
2	1,15	0,53	2,15	13,41	0,68	0,50	3,11	0,19	0,09
3	2,28	1,05	4,64	12,13	1,13	0,30	3,77	0,20	0,08
4	2,74	1,26	7,29	11,34	1,63	0,14	0,24	0,23	0,12
5	2,96	1,36	6,67	10,63	1,99	0,00	0,05	0,24	0,13
6	2,86	1,31	11,38	10,01	2,26	0,00	0,04	0,22	0,13
7	2,94	1,35	13,93	10,13	2,58	0,00	0,04	0,00	0,14
8	2,88	1,32	18,16	9,71	2,75	0,00	0,04	0,00	0,17
9	3,02	1,39	25,10	9,42	2,72	0,00	0,04	0,00	0,16
10	3,30	1,52	20,83	9,01	2,94	0,00	0,04	0,00	0,20
11	3,20	1,47	22,74	8,49	3,16	0,00	0,04	0,00	0,16
12	3,44	1,58	26,74	7,78	3,37	0,00	0,04	0,00	0,21

Anexo 6 – Resultados experimentais do Grupo C, ensaio 6. *Neisseria lactamica* em MC2LAA-YE

Tempo (H)	DO _{540nm}	Massa seca	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,19	0,08	2,40	13,88	0,34	0,64	0,14	0,23	0,09
1	0,42	0,19	2,42	13,89	0,45	0,87	1,28	0,22	0,10
2	0,83	0,37	4,30	13,43	0,77	1,54	2,89	0,22	0,13
3	1,53	0,68	9,95	11,58	1,08	3,27	0,06	0,18	0,10
4	2,65	1,18	12,40	8,52	1,60	6,77	0,13	0,14	0,08
5	3,51	1,56	29,06	5,31	2,54	6,14	0,12	0,13	0,07
6	4,82	2,14	53,23	1,92	4,01	3,03	1,52	0,22	0,08
7	5,26	2,34	79,95	0,13	5,46	2,53	0,07	0,43	0,08
8	5,60	2,49	115,36	0,08	4,43	2,27	0,00	0,28	0,10
9	5,71	2,54	111,72	0,18	3,14	1,82	0,00	0,22	0,09
10	6,04	2,68	136,44	0,33	2,59	1,71	0,00	0,19	0,11
11	5,73	2,55	160,68	0,37	2,50	1,34	0,15	0,20	0,10
12	4,53	2,01	133,07	0,32	2,51	0,93	0,37	0,22	0,12

Anexo 7 – Resultados experimentais do Grupo C, ensaio 7. *Neisseria lactamica* em MC2LAA-YE.

Tempo (H)	DO _{540nm}	Massa seca	OMV (mg/L)	Lactato (g/L)	Acetato (g/L)	Citrato (g/L)	Malato (g/L)	Succinato (g/L)	Amônia (g/L)
0	0,19	0,08	3,36	15,13	0,38	0,70	0,13	0,26	0,09
1	0,44	0,20	2,71	14,24	0,49	0,89	1,30	0,24	0,10
2	0,87	0,39	5,73	12,26	0,62	1,41	2,73	0,20	0,13
3	1,62	0,72	6,85	11,27	1,03	3,41	4,58	0,19	0,10
4	2,48	1,10	17,60	8,27	1,78	7,03	0,15	0,15	0,08
5	3,35	1,49	26,98	4,80	2,79	6,61	5,28	0,15	0,07
6	5,45	2,42	47,92	0,49	4,53	3,06	1,57	0,18	0,08
7	5,29	2,35	74,74	0,16	5,01	2,44	0,15	0,20	0,07
8	5,93	2,64	92,97	0,08	4,03	2,16	0,12	0,28	0,10
9	5,85	2,60	119,01	0,13	2,99	1,90	0,11	0,17	0,09
10	5,43	2,41	119,41	0,24	2,86	1,28	0,43	0,19	0,11
11	4,15	1,85	151,82	0,21	3,14	1,08	0,48	0,17	0,10
12	3,52	1,57	127,60	0,18	4,07	0,96	0,52	0,17	0,12

Anexo 8 – Proteínas identificadas por espectrometria de massas nas OMVs de *N. lactamica*. Ressaltadas em cinza estão as proteínas preditas como componentes de membrana. Dados brutos obtidos nas análises de espectrometria de massas.

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
261401169	OmpA family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	24,7		membrane		48755,34	73,48	Pf00691	230	7,83
421863522	iron(III) ABC transporter, periplasmic binding protein [Neisseria lactamica Y92-1009]	35,8				29090,66	77,34	Protein not found	331	9,61
421862935	putative pilus assembly protein PilC [Neisseria lactamica Y92-1009]	106,6				28535,84	58,33	Protein not found	996	8,78
313669071	pilus assembly protein PilC [Neisseria lactamica 020-06]	108,4				14849,35	45,25	Pf05567	1010	8,76
313667530	class II pilin PilE [Neisseria lactamica 020-06]	15,4				12536,00	18,24	Pf00114	148	8,72
261400034	LysM domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	45,4			metabolic process	11359,92	55,28	Pf01476	407	9,09
313667405	periplasmic protein (possibly peptidoglycan-binding) [Neisseria lactamica 020-06]	45,3			metabolic process	10108,77	59,21	Pf01476	407	8,65
421863357	outer membrane protein Omp85 [Neisseria lactamica Y92-1009]	89,1				9880,98	70,84	Protein not found	806	8,97
422110554	putative cell-binding factor [Neisseria lactamica Y92-1009]	31,7				7367,87	73,61	Protein not found	288	8,35
313667751	hypothetical protein NLA_4060 [Neisseria lactamica 020-06]	31,7	catalytic activity		metabolic process; transport	7028,74	71,18		288	7,40
313669028	pilus secretin [Neisseria lactamica 020-06]	78,4	transporter activity	membrane	cell organization and biogenesis; transport	6577,38	51,65	Pf00263; Pf03958	726	9,20
269214940	type IV pilus secretin PilQ [Neisseria lactamica ATCC 23970]	51,1		membrane		6245,86	64,32	Pf03958	468	9,17
313668630	lipoprotein [Neisseria lactamica 020-06]	43,7				6005,67	80,40	Pf04981	398	7,56

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
261400384	competence lipoprotein ComL [Neisseria lactamica ATCC 23970]	30,6	protein binding			5968,76	72,01		268	8,54
261400246	CsgG family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	23,5			transport	5528,47	73,54	Pf03783	223	9,17
313667752	hypothetical protein NLA_4070 [Neisseria lactamica 020-06]	28,2				5138,51	49,21		252	6,33
261400911	DNA topoisomerase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	8,0	catalytic activity; DNA binding	membrane	metabolic process; response to stimulus; transport	4527,04	83,75	Pf00633; Pf03934; Pf12836	80	9,92
313668962	hypothetical protein NLA_16820 [Neisseria lactamica 020-06]	35,1				4517,24	67,08	Pf09084	325	9,70
313667579	lipoprotein [Neisseria lactamica 020- 06]	21,8				4394,39	76,24	Pf04972	202	9,80
421862640	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	35,4				4216,45	76,76	Protein not found	327	7,69
313669202	chaperonin 60kD subunit [Neisseria lactamica 020-06]	57,4	nucleotide binding; protein binding	cytoplasm	metabolic process	4098,51	67,83	Pf00118	544	5,01
261400930	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	30,4				3428,02	73,29	Pf10670	277	8,02
261401278	c- processing peptidase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	52,5	catalytic activity; protein binding	membrane	metabolic process	3317,45	54,79	Pf00595; Pf03572	491	9,01
313668969	thiol:disulfide interchange protein [Neisseria lactamica 020-06]	28,6				3266,73	67,69	Pf10411	260	8,48
421863026	putative soluble lytic murein transglycosylase [Neisseria lactamica Y92-1009]	67,4				3260,67	59,77	Protein not found	614	9,29

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
261401017	putative thiol:disulfide interchange protein DsbC [Neisseria lactamica ATCC 23970]	28,7				2976,09	56,15	Pf10411	260	8,48
261400598	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	15,2		membrane		2904,59	66,67		138	9,58
422110292	(putative TonB-dependent receptor protein) [Neisseria lactamica Y92-1009]	84,1				2807,59	31,17	Protein not found	770	9,48
15677915	adhesin complex protein [Neisseria meningitidis MC58]	13,3				2695,30	68,55		124	9,57
313667905	glutamate dehydrogenase [Neisseria lactamica 020-06]	48,4	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	2686,47	71,40	Pf00208; Pf02812	444	6,30
261401772	adhesion and penetration protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	183,2	catalytic activity	membrane	metabolic process	2666,34	23,30	Pf02395; Pf03212; Pf03797	1674	7,52
152940867	outer membrane protein [Neisseria lactamica]	35,7	transporter activity	membrane	transport	2554,78	71,81	Pf00267	337	8,78
261400364	CirA protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	77,3	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	2444,74	31,00	Pf07715	713	9,42
269214446	cysteine synthase A [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,9	catalytic activity		metabolic process	2441,70	64,33	Pf00291	328	6,40
313667901	TonB-dependent iron siderophore receptor protein [Neisseria lactamica 020-06]	81,0	metal ion binding; receptor activity; transporter activity	membrane	cellular homeostasis; transport	2396,17	20,46	Pf00593; Pf07715	733	9,50

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
313669193	IgA-specific serine endopeptidase [Neisseria lactamica 020-06]	183,1	catalytic activity	membrane	metabolic process	2260,41	20,82	Pf02395; Pf03212; Pf03797	1676	8,53
261401279	M23 peptidase domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	68,1				2190,16	34,98	Pf01551	629	10,07
269215131	hemoglobin-haptoglobin-utilization protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,4				2072,33	28,79		323	5,39
313668127	membrane peptidase [Neisseria lactamica 020-06]	34,6			metabolic process	2034,13	58,46	Pf01476; Pf01551	337	9,44
269215024	LysM domain/M23 peptidase domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,7			metabolic process	1944,97	44,67	Pf01476; Pf01551	338	9,36
313667844	transferrin-binding protein A [Neisseria lactamica 020-06]	101,9	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	1937,56	25,33	Pf00593; Pf07715	912	9,17
261399980	multiple transferable resistance system protein MtrE [Neisseria lactamica ATCC 23970]	50,2	transporter activity	membrane	transport	1832,76	49,46	Pf02321	467	8,63
261400750	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	13,4				1830,65	50,00	Pf09864	126	7,42
121635396	polyamine permease substrate- binding protein [Neisseria meningitidis FAM18]	41,3	transporter activity		transport	1772,46	77,37	Pf01547	380	5,69
421862521	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	38,4				1721,69	72,08	Protein not found	351	7,05
313668477	pyruvate dehydrogenase subunit [Neisseria lactamica 020-06]	99,4	catalytic activity		metabolic process	1663,61	28,86	Pf00456	887	5,80
422111025	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	18,7				1641,61	53,33	Protein not found	165	9,67
261400248	putative lipoprotein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	23,0		membrane		1635,96	46,05	Pf05643	215	6,00
313668738	hypothetical protein NLA_14470	17,0				1628,85	50,94	Pf03625	159	7,56

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
313667959	[Neisseria lactamica 020-06] hypothetical protein NLA_6180	16,1				1594,37	81,01		158	9,69
421863585	[Neisseria lactamica 020-06] haemoglobin-haptoglobin-utilization protein B) [Neisseria lactamica Y92- 1009]	90,4				1585,58	25,06	Protein not found	810	9,44
313667716	outer membrane protein OmpU [Neisseria lactamica 020-06]	56,2	protein binding	membrane		1575,49	32,99	Pf04575	488	9,89
261400958	lipoprotein, SmpA/OmlA family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	13,7		membrane		1574,42	53,60	Pf04355	125	8,16
422111386	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	17,0				1539,79	57,23	Protein not found	159	8,70
261401355	SPFH domain/band 7 family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,4		membrane		1531,44	43,81	Pf01145	315	5,80
421863080	hypothetical protein NLY_10320 [Neisseria lactamica Y92-1009]	26,3				1526,16	48,10	Protein not found	237	8,19
261400096	outer membrane protein, OmpH family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	19,0	protein binding			1525,50	66,87	Pf03938	166	7,93
313669188	hemoglobin-haptoglobin-utilization protein [Neisseria lactamica 020-06]	36,0				1519,49	20,59		340	6,80
313668887	hypothetical protein NLA_16060 [Neisseria lactamica 020-06]	10,0				1394,58	38,64	Pf03713	88	6,95
421863303	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	27,1				1392,96	53,72	Protein not found	242	7,09
421863401	translation elongation factor Tu [Neisseria lactamica Y92-1009]	42,9				1390,06	39,85	Protein not found	394	5,19
421862737	putative membrane-bound lytic murein transglycosylase A [Neisseria lactamica Y92-1009]	47,9				1377,58	37,87	Protein not found	441	9,45
421863402	elongation factor G (EF-G) [Neisseria lactamica Y92-1009]	77,1				1365,95	27,67	Protein not found	701	5,20
422111400	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	15,9				1343,64	57,62	Protein not found	151	7,44

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
269214228	glutamate dehydrogenase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	24,1	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	1337,35	73,01	Pf00208	226	5,26
313668733	amino acid permease [Neisseria lactamica 020-06]	28,8	transporter activity		metabolic process; transport	1250,48	49,09	Pf00497; Pf00977; Pf09084; Pf12974	275	5,58
313668560	adhesin [Neisseria lactamica 020-06]	336,0		membrane		1171,87	4,14	Pf03895	3259	5,68
261400690	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	17,0				1165,61	54,78	Pf04314	157	8,41
313667902	Ton-B dependent receptor [Neisseria lactamica 020-06]	73,2	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	1156,29	13,40	Pf00593; Pf07715	664	9,50
261400798	CjaA protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	30,1	transporter activity		transport	1135,80	50,70	Pf00497	284	6,15
421862795	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	350,8				1097,11	3,94	Protein not found	3398	5,69
313668211	hemagglutinin/hemolysin-related protein [Neisseria lactamica 020-06]	246,9		membrane		1084,35	8,40	Pf05860	2332	7,69
421862747	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	58,1				1064,69	38,12	Protein not found	522	7,68
261400632	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	8,8		membrane	response to stimulus	1037,18	47,62		84	8,76
313668891	polyamine permease substrate-binding protein [Neisseria lactamica 020-06]	41,1	transporter activity		transport	1022,63	51,72	Pf01547	379	6,43
261401674	hypothetical periplasmic protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	56,7	protein binding			1019,43	36,63	Pf04575	505	9,54
313667765	glutamine synthetase [Neisseria lactamica 020-06]	52,1	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	1011,77	39,83	Pf00120; Pf03951	472	5,34
261401431	ABC transporter, periplasmic	33,9	metal ion		transport	1003,20	39,48	Pf01297	309	7,91

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	substrate-binding protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]		binding							
261401100	phosphate acetyltransferase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	52,1	catalytic activity	membrane	metabolic process	1001,77	31,40	Pf01515	500	5,12
255067457	ribosomal protein L4/L1 family protein [Neisseria sicca ATCC 29256]	23,2	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	992,29	33,01	Pf00573; Pf09960	206	9,92
421863102	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica Y92-1009]	68,9				987,53	26,38	Protein not found	614	8,97
421862602	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase [Neisseria lactamica Y92-1009]	85,1				974,80	28,23	Protein not found	758	5,69
269215210	hemagglutinin/hemolysin family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	257,0				969,69	7,63	Pf05860	2439	7,44
261400184	tetratricopeptide repeat protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	69,1	protein binding			942,08	23,86		616	8,95
313668534	carboxymuconolactone decarboxylase [Neisseria lactamica 020-06]	19,2	antioxidant activity; catalytic activity	membrane	metabolic process	904,34	60,44	Pf02627	182	5,54
421862661	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	53,9				882,94	32,73	Protein not found	498	5,60
261400378	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	17,5				877,05	50,33		151	8,22
261401403	pyruvate, water dikinase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	87,2	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	858,45	24,31	Pf00391; Pf01326; Pf02896	794	5,06
313668897	phosphoenolpyruvate synthase	87,2	catalytic		metabolic	830,61	26,70	Pf00391;	794	5,11

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	[<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]		activity; nucleotide binding		process			Pf01326; Pf02896		
313669112	lipoprotein [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	19,2		membrane		821,18	74,27	Pf04355	171	8,51
261400274	glycine hydroxymethyltransferase [<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970]	44,9	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	812,96	17,79	Pf00155; Pf00266; Pf00464; Pf01212	416	6,67
313668664	outer membrane lipoprotein [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	21,3		membrane	transport	786,82	43,01	Pf03550	193	6,32
261401258	conserved hypothetical protein [<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970]	17,0				784,77	46,88		160	6,96
313669298	lipoprotein [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	31,0		membrane	metabolic process	783,10	22,90	Pf01734	297	9,96
313669269	hypothetical protein NLA_20040 [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	54,1	catalytic activity		metabolic process	782,25	30,80		500	6,01
313667990	hypothetical protein NLA_6510 [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	42,5		membrane		701,90	22,28	Pf02016	395	9,09
313668799	50S ribosomal protein L20 [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	13,7	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	cell organization and biogenesis; metabolic	680,13	40,34	Pf00453	119	11,63
261400299	conserved hypothetical protein [<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970]	14,7				679,67	64,03		139	8,68
261400637	YceI family protein [<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 23970]	20,3				675,09	38,50	Pf04264	187	8,90
313669162	outer membrane lipoprotein GNA1946 [<i>Neisseria lactamica</i> 020-06]	31,3				672,42	22,65	Pf03180	287	5,44
261401525	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, ThiB family [<i>Neisseria lactamica</i> ATCC	36,3	transporter activity	membrane	transport	661,42	34,23		333	9,74

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	23970]									
261400368	pyruvate dehydrogenase complex, E2 component, dihydrolipoamide acetyltransferase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	42,9	catalytic activity	cytoplasm; membrane	metabolic process	655,30	27,98	Pf00198; Pf00364; Pf02817	411	7,72
261400316	L-lactate dehydrogenase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	43,4	catalytic activity; nucleotide binding	membrane	metabolic process	654,52	25,90	Pf00478; Pf01070; Pf01645; Pf03060	390	7,42
313669249	outer membrane solvent tolerance protein [Neisseria lactamica 020-06]	87,8		membrane	cell organization and biogenesis; response to stimulus; transport	653,06	16,23	Pf04453	801	8,09
261400997	ketol-acid reductoisomerase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	36,7	catalytic activity		metabolic process	621,89	32,94	Pf00670; Pf01450; Pf02826; Pf03446; Pf03807; Pf05221; Pf07991	337	6,02
422110483	acetate kinase [Neisseria lactamica Y92-1009]	42,5				619,45	34,42	Protein not found	398	6,42
422111498	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	64,6				616,98	23,56	Protein not found	573	9,42
261401068	CNP1 family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	21,8				610,47	38,58	Pf08750	197	9,48
111075639	47 kDa lipoprotein [Neisseria lactamica]	42,2				607,74	13,14	Pf09375	388	4,97
261401444	single-strand binding protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	19,4	DNA binding		metabolic process	605,12	28,74	Pf00436	174	6,05
313668479	dihydrolipoamide dehydrogenase	61,7	catalytic	cytoplasm	cellular	604,53	18,18	Pf00070;	594	5,25

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	(E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes) [Neisseria lactamica 020-06]		activity		homeostasis; metabolic process; regulation of biological process			Pf00364; Pf00890; Pf01134; Pf01266; Pf01946; Pf02852; Pf03486; Pf07992; Pf12831		
261400303	acyl-CoA dehydrogenase domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	38,7	catalytic activity	membrane	metabolic process	603,27	28,93	Pf02771	363	5,72
313669156	ATP synthase subunit B [Neisseria lactamica 020-06]	17,2	catalytic activity; transporter activity	membrane	metabolic process; transport	575,79	37,18	Pf00430	156	5,72
421863131	isocitrate dehydrogenase [Neisseria lactamica Y92-1009]	80,0				567,15	14,44	Protein not found	741	5,87
313668376	lipoprotein [Neisseria lactamica 020-06]	13,1		membrane		505,05	51,22		123	8,37
261400720	thiol:disulfide interchange protein DsbD [Neisseria lactamica ATCC 23970]	66,2	antioxidant activity; catalytic activity	membrane	cell organization and biogenesis; cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological process; transport	485,01	8,16	Pf00085; Pf00578; Pf02683; Pf11412	613	6,60

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
313668193	fumarate hydratase class II [Neisseria lactamica 020-06]	49,4	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	481,30	17,75	Pf00206; Pf10415	462	6,35
421862888	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	39,8				476,82	19,79	Protein not found	384	9,22
269214604	sporulation and cell division repeat protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,3		membrane	cell division	475,37	21,12	Pf05036	322	9,47
421863600	iron-regulated outer membrane protein FrpB [Neisseria lactamica Y92-1009]	79,2				474,88	16,16	Protein not found	718	9,39
313667877	mafB silent cassette [Neisseria lactamica 020-06]	39,7		membrane		473,65	16,94	Pf06255; Pf07591	366	9,54
254804838	dihydrolipoamide succinyltransferase [Neisseria meningitidis alpha14]	41,5	catalytic activity		metabolic process	468,33	9,67	Pf00198; Pf00364; Pf02817	393	5,26
313668313	bacterioferritin A [Neisseria lactamica 020-06]	18,0	catalytic activity; metal ion binding		cellular homeostasis; metabolic process; transport	466,97	62,34	Pf00210	154	4,82
261401682	toluene tolerance family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	21,1				463,35	31,12	Pf05494	196	9,85
313668852	hypothetical protein NLA_15680 [Neisseria lactamica 020-06]	21,5				461,06	54,40	Pf09832	193	9,11
261400247	putative periplasmic protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	13,6		membrane		456,54	59,02		122	8,92
421863194	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	11,4				455,29	64,65	Protein not found	99	9,70
261400608	acto-N-neotetraose biosynthesis glycosyltransferase LgtB [Neisseria lactamica ATCC 23970]	32,2	catalytic activity		metabolic process	443,46	36,20	Pf01755	279	6,95
313668049	aconitate hydratase [Neisseria lactamica 020-06]	92,7	catalytic activity	membrane	metabolic process	441,95	13,70	Pf00330; Pf06434; Pf11791	861	5,50

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
313669147	lacto-N-neotetraose biosynthesis glycosyl transferase [Neisseria lactamica 020-06]	30,3		membrane	metabolic process	427,93	35,45	Pf01755	268	8,43
313668360	hypothetical protein NLA_10510 [Neisseria lactamica 020-06]	16,5				426,16	36,81		144	9,03
261401328	cytochrome c family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	21,7	metal ion binding			402,55	20,29	Pf00034	207	9,03
269214324	opacity protein opA58 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	27,0	transporter activity	membrane		388,18	19,34	Pf02462	243	9,25
261401141	citrate (Si)-synthase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	48,1	catalytic activity	cytoplasm; membrane	metabolic process	381,10	12,41	Pf00285	427	6,67
261400705	azurin [Neisseria lactamica ATCC 23970]	18,9	metal ion binding			379,87	25,53	Pf00127	188	4,87
121634294	preprotein translocase subunit SecB [Neisseria meningitidis FAM18]	16,3	protein binding	cytoplasm	cell organization and biogenesis; transport	352,32	62,59	Pf02556	147	4,30
313667397	outer membrane transport protein [Neisseria lactamica 020-06]	49,7		membrane		351,77	16,78	Pf03349	459	9,36
421862700	putative lipoprotein [Neisseria lactamica Y92-1009]	10,0				351,10	74,71	Protein not found	87	9,10
313668024	phosphoglycerate mutase [Neisseria lactamica 020-06]	25,9	catalytic activity		metabolic process	344,73	19,82	Pf00300	227	6,55
313667369	membrane protein [Neisseria lactamica 020-06]	46,0	catalytic activity; metal ion binding	membrane	metabolic process	343,05	22,09	Pf04261	421	6,46
261401005	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA [Neisseria lactamica ATCC 23970]	29,0	catalytic activity	membrane	metabolic process	342,94	26,01	Pf00254; Pf01346	273	5,86
261399935	cytochrome c family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	28,7	metal ion binding	membrane		334,70	10,75	Pf00034	279	6,54
261400209	conserved hypothetical protein	11,1				328,44	28,00		100	9,01

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
261401635	[Neisseria lactamica ATCC 23970] 3-isopropylmalate dehydrogenase	45,2	transporter activity	membrane	transport	327,95	16,34	Pf00482	410	9,48
261400683	[Neisseria lactamica ATCC 23970] transglycosylase SLT/LysM domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	70,8			metabolic process	324,87	8,12	Pf01464; Pf01476	653	9,48
313668029	polyamine permease substrate- binding protein [Neisseria lactamica 020-06]	41,8	transporter activity	membrane	transport	317,81	22,61	Pf01547	376	7,37
385323395	hypothetical protein NMV_0276 [Neisseria meningitidis 8013]	12,5				316,68	24,11		112	7,24
421862531	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	34,0				314,83	23,58	Protein not found	318	5,40
261400630	glutamate--cysteine ligase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	49,8	catalytic activity			311,15	20,71	Pf08886	449	5,20
421862743	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	10,4				301,83	32,22	Protein not found	90	9,50
421863265	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	42,7				301,78	16,67	Protein not found	396	8,68
261400461	outer membrane protein, OMP85 family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	67,0		membrane		301,56	4,11	Pf01103	609	8,10
422111496	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	74,8				297,68	10,14	Protein not found	700	6,65
261401749	cell division protein FtsZ [Neisseria lactamica ATCC 23970]	41,3	catalytic activity; nucleotide binding	cytoplasm; membrane	cell division; cell organization and biogenesis; metabolic process	297,36	18,07	Pf00091; Pf12327	393	5,12
261400076	ribosomal protein S4 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	23,2	RNA binding; structural	cytoplasm; ribosome	metabolic process	294,65	25,73	Pf00163; Pf01479	206	9,99

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
			molecule activity							
313668813	lipoprotein [Neisseria lactamica 020-06]	17,6		membrane	cell organization and biogenesis	286,23	29,56	Pf04390	159	6,57
261401764	ribosomal protein L7/L12 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	12,6	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	280,02	28,69	Pf00542	122	4,74
261401884	MafB protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	30,5				267,37	42,36	Pf06255	288	9,54
261401413	preprotein translocase, YajC subunit [Neisseria lactamica ATCC 23970]	9,7		membrane		256,52	36,36	Pf02699	88	9,76
261401380	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,8	catalytic activity			256,50	14,42	Pf03734	326	9,23
261401334	type IV pilus assembly protein PilP [Neisseria lactamica ATCC 23970]	19,6				256,23	35,36	Pf04351	181	5,03
261401684	lipoprotein, VacJ family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	29,5		membrane		250,05	18,18	Pf04333	275	5,01
269214988	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase AmiC [Neisseria lactamica ATCC 23970]	37,9	catalytic activity		metabolic process	248,79	14,66	Pf01520; Pf11741	341	11,00
15677030	sulfate adenylyltransferase subunit 2 [Neisseria meningitidis MC58]	34,7	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	238,64	14,98	Pf01507	307	6,44
261401863	peptidase, M24 family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	64,8	catalytic activity	membrane		237,19	16,05	Pf00557; Pf01321	598	5,49
261401333	type IV pilus assembly protein PilO [Neisseria lactamica ATCC 23970]	23,6		membrane	transport	231,42	11,82	Pf04350; Pf10741	220	5,25
313668762	polyribonucleotide nucleotidyltransferase [Neisseria lactamica 020-06]	76,2	catalytic activity; RNA binding	cytoplasm	metabolic process	223,31	10,48	Pf00013; Pf00575; Pf01138; Pf03725; Pf03726	706	5,50

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
261401189	DSBA thioredoxin domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	23,8	catalytic activity		cellular homeostasis; regulation of biological process	219,67	21,50	Pf01323	214	9,25
261401811	transporter, lactate permease family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	56,9	transporter activity	membrane	transport	216,69	7,39	Pf02652	528	8,88
313667761	hypothetical protein NLA_4160 [Neisseria lactamica 020-06]	17,5			transport	214,76	13,45	Pf03968; Pf06835	171	10,21
313668052	aminopeptidase A [Neisseria lactamica 020-06]	49,9	catalytic activity; metal ion binding	cytoplasm; membrane	metabolic process	206,69	16,67	Pf00883	468	5,22
261400677	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha subunit [Neisseria lactamica ATCC 23970]	85,1	catalytic activity; nucleotide binding	cytoplasm; membrane	metabolic process	205,65	3,56	Pf00317; Pf02867; Pf03477	759	6,46
421862471	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	43,8				203,31	16,10	Protein not found	410	5,30
261399934	glycine dehydrogenase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	104,1	catalytic activity RNA binding;	membrane	metabolic process	202,93	4,53	Pf01212; Pf02347	950	6,00
261400064	ribosomal protein L5 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	20,3	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	197,16	26,26	Pf00281; Pf00673	179	9,48
261400509	DSBA thioredoxin domain protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	25,2			cellular homeostasis; regulation of biological process	196,66	10,82	Pf00085	231	5,83
254804217	aldehyde dehydrogenase A [Neisseria meningitidis alpha14]	52,3	catalytic activity		metabolic process	186,82	11,04	Pf00171	480	5,30
313668577	hypothetical protein NLA_12790	71,2		membrane		183,62	3,86	Pf04829	674	8,65

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
421863050	[Neisseria lactamica 020-06] unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	36,8				181,95	15,32	Protein not found	333	5,31
261400955	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I [Neisseria lactamica ATCC 23970]	36,9	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	179,63	6,41	Pf00044; Pf02800	343	7,14
261399931	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	18,8				177,66	26,16	Pf03886	172	5,27
261401088	surface protein A [Neisseria lactamica ATCC 23970]	18,5	transporter activity	membrane		175,07	22,86	Pf02462	175	9,64
261401332	type IV pilus assembly protein PilN [Neisseria lactamica ATCC 23970]	22,4		membrane		174,49	23,62	Pf05137	199	8,72
121635755	30S ribosomal protein S2 [Neisseria meningitidis FAM18]	26,9	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	171,50	13,64	Pf00318	242	9,03
261401839	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	15,4				160,69	36,09		133	8,05
261401610	putative secreted protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	15,7				160,62	26,43		140	9,47
422111506	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	23,8				156,06	10,14	Protein not found	207	9,10
261400213	NADP-dependent L-serine/L-allo- threonine dehydrogenase YdfG [Neisseria lactamica ATCC 23970]	30,0	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	156,00	17,22	Pf00106; Pf01370; Pf08659	273	5,17
12802684	Exl3L [Neisseria lactamica]	47,0		membrane	metabolic process; regulation of biological process; reproduction	148,91	4,20	Pf01298; Pf03326; Pf05297	452	4,69
313667737	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6- carboxylate N-succinyltransferase	29,3	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	146,19	12,09		273	5,77

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
261400463	[Neisseria lactamica 020-06] iron transporter, outer membrane receptor family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	51,8		membrane		145,28	5,81	Pf01298	499	4,86
422111241	putative outer membrane autotransporter barrel domain protein [Neisseria lactamica Y92- 1009]	104,1				144,71	3,94	Protein not found	938	8,35
313668426	enolase [Neisseria lactamica 020- 06]	42,8	catalytic activity; metal ion binding	cell surface; cytoplasm; cytosol; extracellular	metabolic process	143,72	10,08	Pf00113; Pf03952	397	5,06
261399992	biopolymer transport protein ExbB [Neisseria lactamica ATCC 23970]	24,0	transporter activity	membrane	transport	142,06	11,82	Pf01618	220	9,06
269214625	thiamine biosynthesis protein ThiC [Neisseria lactamica ATCC 23970]	40,3			metabolic process	141,21	8,61	Pf01964	360	5,85
261400813	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit [Neisseria lactamica ATCC 23970]	20,6	catalytic activity; metal ion binding; transporter activity RNA binding; structural molecule activity	membrane	metabolic process; transport	133,18	38,86	Pf00355	193	6,01
15676093	30S ribosomal protein S11 [Neisseria meningitidis MC58]	13,9		cytoplasm; ribosome	metabolic process	132,01	12,21	Pf00411	131	11,25
261400814	ubiquinol-Cytochrome-c reductase, cytochrome b [Neisseria lactamica ATCC 23970]	50,3	catalytic activity	membrane	metabolic process; transport	129,43	8,24	Pf00032	449	9,26
422110461	unnamed protein product [Neisseria lactamica Y92-1009]	74,4				122,52	3,46	Protein not found	693	8,50
421863536	unnamed protein product [Neisseria	22,1				117,88	13,59	Protein not	206	9,35

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	lactamica Y92-1009]							found		
261401007	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	24,0				117,11	10,31	Pf11306	223	9,57
261401676	polyphosphate kinase 2 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	36,2	catalytic activity		metabolic process	115,03	12,62	Pf03976	309	8,57
15676853	succinyl-CoA synthetase subunit alpha [Neisseria meningitidis MC58]	30,5	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	113,30	7,43	Pf00549; Pf02629	296	6,40
261400018	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	11,8				111,88	22,12		113	9,04
15676242	50S ribosomal protein L21 [Neisseria meningitidis MC58]	11,4	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	108,45	38,24	Pf00829	102	9,94
421863457	proline dehydrogenase [Neisseria lactamica Y92-1009]	129,8				108,23	1,92	Protein not found	1201	6,18
269215187	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit [Neisseria lactamica ATCC 23970]	120,0	catalytic activity; DNA binding		metabolic process	106,54	4,74	Pf00562; Pf04561; Pf04563; Pf04565; Pf10385	1076	5,33
121634748	redoxin [Neisseria meningitidis FAM18]	26,9	antioxidant activity; catalytic activity		cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological process	105,70	13,47	Pf00462; Pf00578; Pf08534	245	5,01
313668745	secreted protein [Neisseria lactamica 020-06]	15,6				101,57	15,71		140	9,14
261400780	aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Neisseria lactamica	39,8	catalytic activity;	cytoplasm; membrane	metabolic process	98,75	8,63	Pf01118; Pf02774	371	5,82

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	ATCC 23970]		nucleotide binding; protein binding							
313667898	membrane fusion protein [Neisseria lactamica 020-06]	42,9		membrane	transport	94,83	5,34	Pf00529; Pf12700	412	8,73
50253823	outer membrane phospholipase A precursor [Neisseria lactamica]	42,0	catalytic activity	membrane	metabolic process	94,73	5,60	Pf02253	375	8,97
261400992	antioxidant, AhpC/TSA family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	23,6	antioxidant activity; catalytic activity RNA binding;		metabolic process	89,59	20,45	Pf00578; Pf02630; Pf08534	220	5,07
15676079	50S ribosomal protein L14 [Neisseria meningitidis MC58]	13,4	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	88,72	11,48	Pf00238	122	10,58
261400966	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	29,0	receptor activity; signal transducer activity; transporter activity catalytic activity;	membrane	transport	88,58	11,57	Pf00060; Pf00497	268	5,59
269214998	putrescine transport ATP-binding protein PotG [Neisseria lactamica ATCC 23970]	42,1	nucleotide binding; transporter activity	membrane	metabolic process; transport	84,81	9,09	Pf00005; Pf08402	374	6,00
254804069	serine/threonine transporter SstT [Neisseria meningitidis alpha14]	41,9	transporter activity	membrane	transport	81,16	5,87	Pf00375	409	9,29
261401763	ribosomal protein L10 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	17,6	structural molecule	cytoplasm; membrane;	metabolic process	80,45	30,72	Pf00466	166	8,85

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
313667620	cytochrome C1 precursor [Neisseria lactamica 020-06]	29,7	activity metal ion binding	ribosome		80,33	13,03	Pf02167	261	9,06
261401134	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA [Neisseria lactamica ATCC 23970]	50,7	catalytic activity	cytoplasm; membrane	cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological process	79,02	10,71	Pf00070; Pf01134; Pf02852; Pf07992	467	6,40
269214911	conserved hypothetical protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	8,0				78,44	33,80		71	9,57
313668139	hypothetical protein NLA_8030 [Neisseria lactamica 020-06]	11,5				74,46	19,30		114	4,63
261401750	cell division protein FtsA [Neisseria lactamica ATCC 23970]	44,2	protein binding	membrane	cell division; cell organization and biogenesis; regulation of biological process	72,51	5,56	Pf02491; Pf06277; Pf06723; Pf11104	414	5,76
261400548	fructose-bisphosphate aldolase, class II, Calvin cycle subtype [Neisseria lactamica ATCC 23970]	38,3	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	72,06	5,08	Pf01116; Pf04909	354	5,90
313668603	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component [Neisseria lactamica 020-06]	105,0	catalytic activity		metabolic process	71,41	5,73	Pf00676; Pf02779	942	6,81
269214766	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase [Neisseria lactamica ATCC 23970]	33,2	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	70,66	6,33	Pf00475	300	7,96
261400058	ribosomal protein S3 [Neisseria lactamica ATCC 23970]	25,7	RNA binding;	cytoplasm; ribosome	metabolic process	69,92	6,49	Pf00189; Pf00417;	231	10,35

Accession	Description	MW kDa	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
			structural molecule activity					Pf07650		
261401558	antioxidant, AhpC/TSA family [Neisseria lactamica ATCC 23970]	17,5	antioxidant activity; catalytic activity		cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological process	44,17	10,63	Pf00085; Pf00578; Pf08534	160	9,45
261400755	MafA protein [Neisseria lactamica ATCC 23970]	34,8		membrane		37,13	7,50		320	7,20

Anexo 9 – Proteínas identificadas por espectrometria de massas nas OMVs de *N. meningitidis*. Ressaltadas em cinza estão as proteínas preditas como componentes de membrana. Dados brutos obtidos nas análises de espectrometria de massas

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15677802	molecular chaperone GroEL [Neisseria meningitidis MC58]	57,4	nucleotide binding	cytoplasm	metabolic process	23392,74	90,44	Pf00118	544	5,01
270728027	putative adhesin/invasin [Neisseria meningitidis]	26,5				15029,70	86,22		254	4,67
15676534	iron ABC transporter substrate- binding protein [Neisseria meningitidis MC58]	35,8	metal ion binding; transporter activity		transport	8396,82	79,15	Pf01547	331	9,60
15677557	glutamate dehydrogenase [Neisseria meningitidis MC58]	48,5	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	7150,24	90,77	Pf00208; Pf02812	444	6,30
416189959	translation elongation factor Tu, partial [Neisseria meningitidis ES14902]	41,6				2246,97	62,76	Protein not found	384	5,06
15676598	IgA-specific serine endopeptidase [Neisseria meningitidis MC58]	201,0	catalytic activity		metabolic process	2104,01	23,58	Pf02395; Pf03212; Pf03797	1815	9,09
385853523	L-cystine ABC transporter, periplasmic L-cystine-binding protein [Neisseria meningitidis H44/76]	28,7	transporter activity		metabolic process; transport	2072,02	75,91	Pf00497; Pf00977; Pf12974	274	6,29
15677424	ketol-acid reductoisomerase [Neisseria meningitidis MC58]	36,4	catalytic activity		metabolic process	2007,14	64,99	Pf00670; Pf01450; Pf02826; Pf03446; Pf03807; Pf07991	337	5,97
15677074	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase [Neisseria meningitidis MC58]	52,4	catalytic activity; metal ion binding;		metabolic process	1978,74	50,51	Pf00478; Pf00571; Pf01070; Pf01645;	487	7,23

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
			protein binding					Pf03060		
15676847 416198003	type II citrate synthase [Neisseria meningitidis MC58] putative thiol:disulfide interchange protein DsbC [Neisseria meningitidis CU385]	48,1 30,4	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	1775,93 1753,79	56,91 72,63	Pf00285 Protein not found	427 274	6,80 8,94
15676260	cell-binding factor [Neisseria meningitidis MC58]	31,4	catalytic activity		metabolic process; transport metabolic process	1658,66	70,14	Pf00639	288	9,22
15677207	pyruvate dehydrogenase subunit E1 [Neisseria meningitidis MC58]	99,5	catalytic activity			1451,29	51,41	Pf00456	887	5,85
12214217	transferrin binding protein B subunit [Neisseria meningitidis]	73,6		membrane		1404,52	25,66	Pf01298	682	6,06
121635396	polyamine permease substrate- binding protein [Neisseria meningitidis FAM18]	41,3	transporter activity		transport	1351,04	71,32	Pf01547	380	5,69
421563271 111075591	gamma-glutamyltransferase [Neisseria meningitidis NM2795] 47 kDa lipoprotein [Neisseria meningitidis]	63,5 42,2				1314,77 1286,80	54,99 45,62	Protein not found Pf09375	591 388	6,48 4,91
121635505	glutamine synthetase [Neisseria meningitidis FAM18]	52,0	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	1267,39	49,36	Pf00120; Pf03951	472	5,47
1381240	class 3 outer membrane porin [Neisseria meningitidis]	33,0	transporter activity	membrane	transport	1256,21	81,97	Pf00267	305	6,46
15677210	dihydrolipoamide dehydrogenase (E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes) [Neisseria meningitidis MC58]	61,8	catalytic activity	cytoplasm	cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological	1254,95	43,77	Pf00070; Pf00364; Pf00890; Pf01134; Pf01266; Pf01946;	594	5,21

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
					process			Pf02852; Pf03486; Pf07992; Pf12831 Pf10670	268	7,69
	hypothetical protein NMB1475 [Neisseria meningitidis MC58]	30,2				1254,42	66,79			
15677329	outer membrane protein OMP85 [Neisseria meningitidis FAM18]	88,4		membrane		1242,96	34,63	Pf01103; Pf07244	797	8,66
121634057	adhesin complex protein [Neisseria meningitidis MC58]	13,3				1216,78	66,94		124	9,57
15677915	dihydrolipoamide succinyltransferase [Neisseria meningitidis MC58]	41,5	catalytic activity		metabolic process	1215,49	42,75	Pf00198; Pf00364; Pf02817 Pf09864	393	5,26
15676849	putative lipoprotein [Neisseria meningitidis M01-240149]	13,6				1210,27	72,22		126	6,52
385341614	outer membrane protein class 4 [Neisseria meningitidis MC58]	26,2	transporter activity	membrane	transport	1143,60	53,31	Pf00691	242	7,42
15676296	carboxy-terminal peptidase [Neisseria meningitidis MC58]	53,2	catalytic activity; protein binding		metabolic process	1101,64	59,31	Pf00595; Pf03572	494	9,13
15677198	pilus-associated protein [Neisseria meningitidis Z2491]	113,7				1087,48	12,44	Pf05567	1037	9,28
218767570	PilC family protein [Neisseria meningitidis M01-240355]	117,3				1083,53	14,88	Pf05567	1075	9,26
385855865	pilQ protein [Neisseria meningitidis MC58]	82,4	transporter activity	membrane	cell communicati on; cell organization and biogenesis; response to stimulus; transport	1076,65	33,16	Pf00263; Pf03958	769	9,42

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15678016	type IV pilus assembly protein PilC [Neisseria meningitidis M0579]	113,0				1075,21	19,40	Protein not found	1031	9,28
416189060	membrane fusion protein [Neisseria meningitidis MC58]	42,8		membrane	transport	1057,12	57,77	Pf00529; Pf12700	412	8,94
15677563	fumarate hydratase [Neisseria meningitidis MC58]	49,3	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	1049,44	48,92	Pf00206; Pf10415	462	6,20
15677314	Chain A, The Crystal Structure Of Transferrin Binding Protein A (Tbpa) From Neisseria Meningitidis Serogroup B In Complex With The C-Lobe Of Human Transferrin	101,0	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	1034,33	26,11	Pf00593; Pf07715	904	9,41
375332607	outer membrane protein [Neisseria meningitidis MC58]	18,5	metal ion binding	membrane	metabolic process; transport	1002,36	46,45	Pf00127	183	4,81
15677385	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Neisseria meningitidis MC58]	37,4	catalytic activity		metabolic process; transport	999,13	68,97	Pf00639; Pf09312	348	9,64
15676205	sulfate-binding protein [Neisseria meningitidis FAM18]	38,4	catalytic activity; transporter activity		transport	996,65	63,53	Pf01547; Pf12727; Pf12849	351	7,05
121634818	hypothetical protein NMC0101 [Neisseria meningitidis FAM18]	45,5			metabolic process	990,45	50,12	Pf01476	405	7,61
121633987	transferrin binding protein B [Neisseria meningitidis serogroup B]	71,6		membrane		969,60	14,18	Pf01298	670	6,27
9955715	transferrin-binding protein A [Neisseria meningitidis Z2491]	101,8	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	950,02	25,05	Pf00593; Pf07715	910	9,29
218768775	type IV pilus assembly protein	110,7				945,12	20,48	Pf05567	1006	9,06

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	[Neisseria meningitidis 053442]									
161869369	transferrin-binding protein A [Neisseria meningitidis 053442]	101,8	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	910,61	25,27	Pf00593; Pf07715	914	9,36
161870612	transferrin binding protein B [Neisseria meningitidis serogroup B]	73,7		membrane		853,18	18,27	Pf01298	684	6,70
9955717	cysteine synthase [Neisseria meningitidis MC58]	32,8	catalytic activity		metabolic process	846,06	56,77	Pf00291	310	6,40
15676661	type IV pilus assembly protein PilC [Neisseria meningitidis 961- 5945]	115,3				839,39	13,62	Protein not found	1050	9,00
416199414	dihydrolipoamide acetyltransferase [Neisseria meningitidis FAM18]	55,0	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	823,53	40,34	Pf00198; Pf00364; Pf02817	533	5,45
121635050	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 [Neisseria meningitidis MC58]	105,0	catalytic activity		metabolic process	820,41	29,51	Pf00676; Pf02779	942	6,70
15676848	ATP synthase F0F1 subunit beta [Neisseria meningitidis MC58]	50,4	catalytic activity; nucleotide binding; transporter activity	membrane	metabolic process; transport	773,33	37,42	Pf00006; Pf00306; Pf02874	465	5,16
15677764	50S ribosomal protein L4 [Neisseria meningitidis alpha275]	21,1	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	753,31	40,54	Pf00573; Pf09960	185	10,0 7
254672672	aldehyde dehydrogenase A [Neisseria meningitidis G2136]	51,7	catalytic activity	membrane	metabolic process	751,86	34,53	Pf00171	475	5,24
385340814	ATP synthase F0F1 subunit alpha [Neisseria meningitidis MC58]	55,3	catalytic activity; nucleotide binding;	membrane	metabolic process; transport	749,71	49,90	Pf00006; Pf00306; Pf02663; Pf02874	515	5,58

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pl
15677766	hypothetical protein NMB0872 [Neisseria meningitidis MC58]	68,6	transporter activity			739,58	31,11		614	9,25
15676768	multidrug efflux pump channel protein [Neisseria meningitidis MC58]	50,4	protein binding	membrane	transport	730,11	48,61	Pf02321	467	8,37
15677561	type IV pilus assembly protein PilC [Neisseria meningitidis M13399]	113,0	transporter activity			728,02	11,80	Protein not found	1034	9,16
416184795	competence lipoprotein [Neisseria meningitidis MC58]	30,9	protein binding	membrane	cell communication; response to stimulus	724,76	49,06	Pf08139	267	9,01
15676601	polynucleotide phosphorylase [Neisseria meningitidis Z2491]	76,2	catalytic activity; RNA binding	cytoplasm	metabolic process	711,43	26,06	Pf00013; Pf00575; Pf01138; Pf03725; Pf03726	706	5,50
218767879	lactoferrin-binding protein precursor [Neisseria meningitidis]	79,4		membrane		705,68	19,94	Pf01298	722	4,83
4884691	DNA-directed RNA polymerase subunit beta [Neisseria meningitidis Z2491]	155,5	catalytic activity; DNA binding		metabolic process	701,02	17,03	Pf00562; Pf04560; Pf04561; Pf04563; Pf04565; Pf10385	1392	5,52
218767181	drug efflux protein [Neisseria meningitidis FAM18]	113,9	transporter activity	membrane	transport	687,59	14,34	Pf00873	1067	7,03
121635351	class 1 outer membrane protein [Neisseria meningitidis]	39,8	transporter activity	membrane	transport	686,48	52,72	Pf00267	368	8,18
281336595	hypothetical protein NMB0783 [Neisseria meningitidis MC58]	17,0				684,52	65,41	Pf03625	159	8,16

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676681	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase [Neisseria meningitidis alpha14]	33,7	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	671,11	34,43	Pf00475	305	8,43
254805352	L-lactate dehydrogenase [Neisseria meningitidis G2136]	43,0	catalytic activity; nucleotide binding	membrane	metabolic process	650,70	34,97	Pf00478; Pf01070; Pf01645; Pf03060	386	7,03
385340277	opacity protein [Neisseria meningitidis]	26,2	transporter activity	membrane		647,12	39,15	Pf02462; Pf03797	235	9,38
2367645	hemolysin [Neisseria meningitidis MC58]	21,7				636,04	52,97	Pf04972	202	9,80
15677911	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein [Neisseria meningitidis MC58]	41,2	transporter activity		transport	619,77	43,80	Pf01547	379	5,87
15676526	delta-aminolevulinic acid dehydratase [Neisseria meningitidis MC58]	36,8	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	586,74	28,83	Pf00490	333	5,39
15676699	30S ribosomal protein S1 [Neisseria meningitidis G2136]	60,9	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; membrane; ribosome	metabolic process	576,14	21,11	Pf00575	559	5,05
385340209	conserved hypothetical protein [Neisseria meningitidis H44/76]	41,3				570,01	39,73	Protein not found	375	9,20
427826787	elongation factor G [Neisseria meningitidis FAM18]	77,2	catalytic activity; nucleotide binding; RNA binding	cytoplasm	metabolic process	569,30	15,83	Pf00009; Pf00679; Pf03144; Pf03764	701	5,17
121634013	phosphoenolpyruvate synthase [Neisseria meningitidis MC58]	87,1	catalytic activity;		metabolic process	558,79	21,28	Pf00391; Pf01326;	794	5,12

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
			metal ion binding; nucleotide binding					Pf02896		
15676521	hypothetical protein NMC1114 [Neisseria meningitidis FAM18]	34,5		membrane		542,33	36,83	Pf01145	315	5,80
121634908	outer membrane lipoprotein [Neisseria meningitidis MC58]	31,2				541,82	46,34	Pf03180	287	5,34
15677776	hypothetical protein NMBH4476_1139 [Neisseria meningitidis H44/76]	20,4				537,46	58,82	Pf04264	187	8,68
385853281	aminopeptidase A [Neisseria meningitidis alpha14]	49,8	catalytic activity; metal ion binding	cytoplasm	metabolic process	534,22	24,79	Pf00883	468	5,16
254805324	PilC [Neisseria meningitidis]	113,6				533,67	9,06	Pf05567	1037	9,06
1246818	factor H binding protein [Neisseria meningitidis]	23,7				524,27	40,64	Pf08794	219	7,64
270727122	peptidyl-prolyl isomerase [Neisseria meningitidis FAM18]	28,5	catalytic activity	membrane	metabolic process	521,23	47,39	Pf00254; Pf01346	268	5,86
121635224	polyamine permease substrate- binding protein [Neisseria meningitidis FAM18]	41,9	transporter activity		transport	510,08	43,09	Pf01547	376	6,32
121635252	5- methyltetrahydropteroyltriglutam ate/homocysteine S- methyltransferase [Neisseria meningitidis MC58]	85,0	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	509,71	18,34	Pf01717; Pf08267	758	5,43
15676837	glycine dehydrogenase [Neisseria meningitidis CU385]	103,8				489,99	15,68	Protein not found	950	5,90
416195578	30S ribosomal protein S2 [Neisseria meningitidis H44/76]	23,8	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	462,97	51,85	Pf00318	216	8,50

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
385854141	succinyl-CoA synthetase subunit beta [Neisseria meningitidis MC58]	41,3	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding		metabolic process	460,71	28,35	Pf00549; Pf08442	388	5,14
15676852	tonB dependent receptor [Neisseria meningitidis H44/76]	102,4				434,51	13,12	Protein not found	907	9,39
427827605	ABC transporter substrate-binding protein [Neisseria meningitidis MC58]	36,4	transporter activity		transport	427,40	48,05		333	9,70
15675981	transketolase [Neisseria meningitidis MC58]	71,6	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	423,34	37,03	Pf00456; Pf02779; Pf02780	659	5,71
15677313	dihydrolipoamide dehydrogenase [Neisseria meningitidis FAM18]	50,1	catalytic activity	cytoplasm	cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological process	422,30	17,61	Pf00070; Pf00890; Pf01134; Pf02852; Pf03486; Pf07992; Pf12831	477	6,30
121634758	50S ribosomal protein L5 [Neisseria meningitidis MC58]	20,3	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	413,49	39,11	Pf00281; Pf00673	179	9,48
15676081	bacterioferritin A [Neisseria meningitidis MC58]	17,9	catalytic activity; metal ion binding		cellular homeostasis; metabolic process; transport	411,85	72,73	Pf00210	154	4,82
15677080	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-	129,9	catalytic activity		metabolic process;	410,08	10,99	Pf00171; Pf01619	1201	6,47

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	carboxylate dehydrogenase [Neisseria meningitidis MC58]				regulation of biological process					
15676314	type IV pilus assembly protein PilP [Neisseria meningitidis M01-240149]	17,1				409,93	45,81	Pf04351	155	5,06
385341338	oxidoreductase [Neisseria meningitidis FAM18]	20,7				402,91	48,40	Pf02525; Pf03358	188	6,02
121634288	hypothetical protein NMB1035 [Neisseria meningitidis MC58]	8,7		membrane	response to stimulus	402,73	47,62		84	8,76
15676922	lipoprotein [Neisseria meningitidis MC58]	13,9		membrane		402,40	58,40	Pf04355	125	8,73
15676131	transferrin-binding protein 2 [Neisseria meningitidis M0579]	75,3				400,61	8,36	Protein not found	706	6,51
416186646	adhesion and penetration protein [Neisseria meningitidis MC58]	159,9	catalytic activity	membrane	metabolic process	395,72	8,72	Pf02395; Pf03212; Pf03797	1457	9,17
15677813	ATP synthase F0F1 subunit B [Neisseria meningitidis MC58]	17,1	transporter activity	membrane	metabolic process; transport	394,92	48,72	Pf00430	156	5,72
15677768	preprotein translocase subunit SecB [Neisseria meningitidis MC58]	16,3	protein binding	cytoplasm	cell organization and biogenesis; transport	390,09	57,82	Pf02556	147	4,27
15677629	pilO protein [Neisseria meningitidis MC58]	23,3			transport	375,03	29,77	Pf04350; Pf10741	215	5,14
15677647	hemoglobin receptor [Neisseria meningitidis]	87,0	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	363,10	10,55	Pf00593; Pf07715	768	9,32
209363302	Chain A, The Crystal Structure Of Thioredoxin-Related Protein From Neisseria Meningitidis	16,8	antioxidant activity; catalytic		cellular homeostasis; metabolic	362,24	39,74	Pf00085; Pf00578; Pf08534	151	9,25

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	Serogroup B		activity		process; regulation of biological process					
332639892	hypothetical protein NMB1333 [Neisseria meningitidis MC58]	65,7				359,36	20,64	Pf01551	596	9,99
15677199	NMB1163-like protein [Neisseria meningitidis]	9,9				357,69	26,14		88	8,37
224022312	lactoferrin-binding protein A [Neisseria meningitidis G2136]	105,8	receptor activity; transporter activity	membrane	transport	356,91	7,42	Pf00593; Pf07715	944	9,39
385340416	ferric enterobactin receptor [Neisseria meningitidis M04- 240196]	80,0	metal ion binding; receptor activity; transporter activity	membrane	cellular homeostasis; transport	351,90	20,19	Pf00593; Pf07715	723	9,48
385852070	outer membrane protein OmpH [Neisseria meningitidis MC58]	19,1	protein binding			350,62	27,11	Pf03938	166	9,16
15676108	50S ribosomal protein L9 [Neisseria meningitidis FAM18]	15,8	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	347,21	38,00	Pf01281; Pf03948	150	7,25
121635031	oligopeptidase A [Neisseria meningitidis MC58]	76,0	catalytic activity		metabolic process	346,84	17,70	Pf01432	678	5,30
15676140	Chain A, CuZn SUPEROXIDE DISMUTASE FROM NEISSERIA MENINGITIDIS	17,3	metal ion binding		metabolic process	342,60	44,51	Pf00080	164	6,51
118137289	50S ribosomal protein L7/L12 [Neisseria meningitidis MC58]	12,6	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	329,92	34,96	Pf00542	123	4,68
15676059	phosphate acetyltransferase	52,2	catalytic		metabolic	329,08	26,80	Pf01515	500	5,00

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	[Neisseria meningitidis MC58]		activity		process					
15676533	pilus assembly protein [Neisseria meningitidis FAM18]	22,2		membrane		323,88	30,15	Pf05137	199	9,03
121634276	DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit [Neisseria meningitidis N1568]	153,5				321,70	8,86	Protein not found	1389	7,36
416166462	ribosomal protein L19, partial [Neisseria meningitidis 961- 5945]	13,6				318,30	62,18	Protein not found	119	10,4 0
416206467	ribosomal protein L1 [Neisseria meningitidis H44/76]	22,6				314,75	38,71	Protein not found	217	9,01
427826225	chaperone protein DnaK [Neisseria meningitidis M01- 240149]	67,4	nucleotide binding; protein binding		cell organization and biogenesis; metabolic process; response to stimulus	311,70	15,15	Pf00012; Pf06723	627	4,94
385342451	Chain A, Solution Structure Of The C103s Mutant Of The N- Terminal Domain Of Dsbd From Neisseria Meningitidis	14,1				308,60	33,59	Pf11412	128	4,74
212374842	50S ribosomal protein L2 [Neisseria meningitidis FAM18]	30,1	catalytic activity; RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	308,12	18,41	Pf00181; Pf03947	277	10,7 4
121634019	ExbB, partial [Neisseria meningitidis 961-5945]	23,7				306,13	37,04	Protein not found	216	9,47
416201500	pilM protein [Neisseria meningitidis MC58]	41,3			cell organization	303,20	36,93	Pf11104	371	5,20

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15677646	ATP synthase F1 subunit gamma [Neisseria meningitidis H44/76]	28,2	catalytic activity; transporter activity	membrane	and biogenesis metabolic process; transport	294,79	20,16	Pf00231	253	7,02
385853982	histidine-binding periplasmic protein [Neisseria meningitidis FAM18]	29,1	receptor activity; signal transducer activity; transporter activity	membrane	transport	292,73	33,96	Pf00060; Pf00497	268	5,14
121635265	Chain A, Crystal Structure Of Pilw, Widely Conserved Type Iv Pilus Biogenesis Factor	25,3				290,59	38,22		225	6,77
189096068	soluble lytic murein transglycosylase [Neisseria meningitidis MC58]	67,7	catalytic activity			284,73	18,18	Pf01464	616	9,31
15677779	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent, monomeric type [Neisseria meningitidis MC58]	80,1	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	277,43	14,84	Pf03971	741	5,87
15676815	Cytochrome c family protein, partial [Neisseria meningitidis 961-5945]	26,6				265,81	28,19	Protein not found	259	5,83
416201797	putative zinc-type alcohol dehydrogenase [Neisseria meningitidis 8013]	37,9	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding	membrane	metabolic process	263,44	16,10	Pf00107; Pf08240	354	5,53
385324638	50S ribosomal protein L15 [Neisseria meningitidis MC58]	14,9	RNA binding;	cytoplasm; ribosome	metabolic process	260,07	20,83	Pf00828	144	11,30

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676088	aconitate hydratase 2 [Neisseria meningitidis alpha275]	49,3	structural molecule activity catalytic activity		metabolic process	258,38	21,18	Pf06434; Pf11791	458	6,48
254672900	hypothetical protein NMB2074 [Neisseria meningitidis MC58]	31,1				256,47	21,18	Pf05036	288	8,84
15677896	glutamate dehydrogenase [Neisseria meningitidis MC58]	46,2	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	255,91	18,29	Pf00208; Pf02812; Pf02826	421	5,36
15677330	trigger factor [Neisseria meningitidis 053442]	48,1	catalytic activity	cytoplasm	cell division; metabolic process; transport	238,97	9,86	Pf00254; Pf05697; Pf05698	436	4,83
161870185	hypothetical protein NME_0862 [Neisseria meningitidis alpha153]	17,3	metal ion binding			231,60	27,04	Pf00034	159	9,16
254670297	type II secretion system protein F domain-containing protein [Neisseria meningitidis G2136]	44,5	transporter activity	membrane	transport	223,64	16,67	Pf00482	402	9,33
385340733	hypothetical protein NMB1580 [Neisseria meningitidis MC58]	33,6				221,65	14,05		299	9,01
15677430	hypothetical protein NMB1084 [Neisseria meningitidis MC58]	19,9				218,79	29,48		173	5,69
15676965	aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Neisseria meningitidis MC58]	39,8	catalytic activity; nucleotide binding; protein binding	cytoplasm	metabolic process	214,32	11,59	Pf01118; Pf02774	371	5,62
15677900	thiol:disulfide interchange	25,4	catalytic		cellular	213,04	29,87	Pf00085;	231	5,48

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	protein DsbA [Neisseria meningitidis MC58]		activity		homeostasis; regulation of biological process			Pf01323		
15676216	30S ribosomal protein S4 [Neisseria gonorrhoeae NCCP11945]	22,1	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	211,88	26,53	Pf00163; Pf01479	196	9,95
194099938	preprotein translocase subunit SecA [Neisseria meningitidis FAM18]	103,3	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding	cytoplasm; membrane	transport	211,49	10,04	Pf00270; Pf01043; Pf02810; Pf07516; Pf07517	916	5,21
121635205	Chain A, Crystal Structure Of Reduced Dsba1 From Neisseria Meningitidis	21,5			cellular homeostasis; regulation of biological process	206,92	40,93	Pf00085	193	5,43
255311760	succinyl-CoA synthetase subunit alpha [Neisseria meningitidis MC58]	30,5	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	206,34	19,59	Pf00549; Pf02629	296	6,40
15676853	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A [Neisseria meningitidis MC58]	48,6	catalytic activity		metabolic process; transport	204,11	14,99	Pf00364; Pf05896; Pf11973	447	6,64
15676474	50S ribosomal protein L3 [Neisseria meningitidis MC58]	22,7	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	203,82	21,50	Pf00297	214	10,04
15676069	30S ribosomal protein S13 [Neisseria meningitidis MC58]	13,4	RNA binding;	cytoplasm; ribosome	metabolic process	201,50	19,17	Pf00416	120	10,40

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676092	2-methylisocitrate lyase [Neisseria meningitidis 053442]	31,6	structural molecule activity catalytic activity		metabolic process	200,09	17,53	Pf00463	291	5,40
161870645	50S ribosomal protein L10 [Neisseria meningitidis MC58]	17,6	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	199,64	58,43	Pf00466	166	8,32
15676058	periplasmic transport protein [Neisseria meningitidis FAM18]	21,1				198,59	24,49	Pf05494	196	9,89
121635618	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha [Neisseria meningitidis G2136]	84,4	catalytic activity; nucleotide binding	cytoplasm; membrane	metabolic process	197,32	4,25	Pf00317; Pf02867; Pf03477	753	6,29
385340201	HemX family protein [Neisseria meningitidis M01-240355]	45,5	catalytic activity	membrane	metabolic process	196,22	13,25	Pf04375	415	5,40
385854924	cell division protein FtsZ [Neisseria meningitidis OX99.30304]	38,3				195,90	20,83	Protein not found	360	5,16
416168449	carbamoyl phosphate synthase large subunit [Neisseria meningitidis FAM18]	117,3	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding		metabolic process	195,38	7,28	Pf00289; Pf01071; Pf02142; Pf02222; Pf02655; Pf02786; Pf02787; Pf07478; Pf08443	1071	5,22
121634229	hypothetical protein NMB1557 [Neisseria meningitidis MC58]	17,0				194,25	24,84	Pf04314	157	8,90
15677408	ATP-dependent chaperone ClpB, partial [Neisseria meningitidis 961-5945]	66,5				193,17	6,14	Protein not found	603	5,62
416203194	peptidyl-prolyl cis-trans	18,8	catalytic		metabolic	193,14	37,87	Pf00160	169	5,25

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676689	isomerase [Neisseria meningitidis MC58] succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit [Neisseria meningitidis MC58]	64,5	activity catalytic activity		process metabolic process	184,19	7,33	Pf00890; Pf02910	587	6,32
15676843	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit [Neisseria meningitidis MC58]	20,6	catalytic activity; metal ion binding; transporter activity	membrane	metabolic process; transport	182,00	40,93	Pf00355	193	5,63
15677875	hypothetical protein NMB2139 [Neisseria meningitidis MC58]	30,9			metabolic process	180,49	17,17	Pf01734	297	9,99
15677952	catalase [Neisseria meningitidis FAM18]	57,2	antioxidant activity; catalytic activity; metal ion binding		metabolic process; response to stimulus	178,23	11,71	Pf00199; Pf06628	504	6,77
121634089	lipoprotein [Neisseria meningitidis MC58]	19,2		membrane		175,71	57,89	Pf04355	171	8,51
15677730	hypothetical protein NMC1824 [Neisseria meningitidis FAM18]	27,3				172,83	33,05		239	5,87
121635518	putative outer membrane protein [Neisseria meningitidis]	34,8	protein binding			168,47	14,61	Pf04575	308	9,66
7649688	DnaJ, partial [Neisseria meningitidis]	38,9	metal ion binding; nucleotide binding; protein binding		metabolic process; response to stimulus	168,41	7,26	Pf00226; Pf00684; Pf01556	358	8,00
302028132	30S ribosomal protein S12 [Neisseria meningitidis MC58]	13,7	RNA binding; structural	cytoplasm; ribosome	metabolic process	165,17	30,89	Pf00164	123	10,64

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676064	recA [Neisseria lactamica]	25,4	molecule activity catalytic activity; DNA binding; nucleotide binding		cell communicati on; metabolic process; response to stimulus	164,18	12,66	Pf00154; Pf06745; Pf08423	237	6,00
1890214	cell division protease FtsH [Neisseria meningitidis WUE 2594]	70,2	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding; protein binding	membrane	cell division; metabolic process; regulation of biological process; response to stimulus	162,65	9,58	Pf00004; Pf00158; Pf01078; Pf01434; Pf05496; Pf06068; Pf06480; Pf06745; Pf07724; Pf07728	637	5,27
385337750	hypothetical protein NMC0013 [Neisseria meningitidis FAM18]	46,1	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	159,68	12,11	Pf04261	421	7,14
121633913	hypothetical protein NMB1073 [Neisseria meningitidis MC58]	42,0	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	159,45	8,78	Pf00246	376	4,74
15676957	Chain A, Oxidoreductase Nmdb3a From Neisseria Meningitidis	21,9	catalytic activity			158,38	25,13	Pf01323	195	9,16
197107213	hypothetical protein NMB0844 [Neisseria meningitidis MC58]	11,8				157,09	42,06	Pf11607	107	7,65
15676740	thiamine biosynthesis protein ThiC [Neisseria meningitidis MC58]	71,0	catalytic activity; metal ion		metabolic process	156,16	8,53	Pf01964	633	6,18

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15677863	enoyl-(acyl carrier protein) reductase [Neisseria meningitidis MC58]	27,7	binding catalytic activity; nucleotide binding		cell organization and biogenesis; metabolic process	156,13	15,71	Pf00106	261	6,14
15676251	50S ribosomal protein L13 [Neisseria meningitidis G2136]	15,1	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	155,15	28,57	Pf00572	133	9,70
385340904	30S ribosomal protein S3 [Neisseria meningitidis MC58]	25,8	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	154,07	19,57	Pf00189; Pf00417; Pf07650	230	10,4 2
15676075	ribosomal protein S6, partial [Neisseria meningitidis 961-5945]	8,9				151,42	55,00	Protein not found	80	7,59
416203916	hypothetical protein NMB1652 [Neisseria meningitidis MC58]	46,4				150,12	18,63	Pf05167	451	5,15
15677501	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase [Neisseria meningitidis MC58]	32,0	catalytic activity		metabolic process	148,55	10,73	Pf00483; Pf12804	289	6,06
15676538	hypothetical protein NMB1468 [Neisseria meningitidis MC58]	10,8				147,81	22,43		107	4,65
15677322	ribose-phosphate pyrophosphokinase [Neisseria meningitidis alpha275]	34,4	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding	cytoplasm	metabolic process	144,14	7,89	Pf00156	317	6,93
254673309	lactoferrin-binding protein A [Neisseria meningitidis MC58]	105,6	receptor activity; transporter	membrane	transport	139,75	2,76	Pf00593; Pf07715	943	9,36

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
			activity							
15677392	30S ribosomal protein S8 [Neisseria meningitidis MC58]	14,1	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	136,44	29,23	Pf00410	130	9,72
15676083	phosphoserine aminotransferase [Neisseria meningitidis FAM18]	41,4	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	136,30	11,68	Pf00266	368	5,72
121635280	putative glutamate--cysteine ligase [Neisseria meningitidis alpha275]	49,6	catalytic activity			134,56	12,47	Pf08886	449	5,38
254673512	branched-chain amino acid aminotransferase [Neisseria meningitidis 053442]	34,4	catalytic activity		metabolic process	134,29	9,81	Pf01063	316	5,68
161870733	putative oxidoreductase [Neisseria meningitidis WUE 2594]	30,0	catalytic activity; nucleotide binding	membrane	metabolic process	133,97	23,44	Pf00106; Pf08659	273	5,17
385337845	carbon starvation protein A [Neisseria meningitidis 053442]	70,5		membrane	cell communicati on; response to stimulus	132,95	7,00	Pf02554	657	7,90
161870357	hypothetical protein NMB1124 [Neisseria meningitidis MC58]	22,9		membrane		128,82	22,79	Pf05643	215	6,32
15677001	50S ribosomal protein L20 [Neisseria meningitidis alpha153]	9,2	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	125,50	42,50	Pf00453	80	10,7 8
254669803	outer membrane lipoprotein [Neisseria meningitidis]	30,0	catalytic activity			122,31	19,64	Pf03562	275	9,88
270355454	dihydrodipicolinate synthase [Neisseria meningitidis MC58]	30,9	catalytic activity;	cytoplasm	metabolic process	119,91	14,09	Pf00701; Pf02126	291	5,58

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676823	50S ribosomal protein L6 [Neisseria meningitidis MC58]	18,9	metal ion binding RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	118,51	27,12	Pf00347	177	9,63
15676084	RNA polymerase sigma factor RpoD [Neisseria meningitidis MC58]	73,8	DNA binding		metabolic process; regulation of biological process	118,18	6,07	Pf00140; Pf03979; Pf04539; Pf04542; Pf04545; Pf04546	642	5,00
15677390	30S ribosomal protein S11 [Neisseria meningitidis ATCC 13091]	9,2	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	117,61	26,14	Pf00411	88	10,7 6
304388966	argininosuccinate lyase [Neisseria meningitidis FAM18]	51,2	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	116,24	10,70	Pf00206; Pf10397	458	5,43
121634429	lipoprotein NlpD, partial [Neisseria meningitidis ATCC 13091]	18,4				113,12	17,78	Pf01551	180	9,99
304387121	serine hydroxymethyltransferase [Neisseria meningitidis MC58]	44,9	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	112,81	9,13	Pf00155; Pf00266; Pf00464; Pf01212	416	6,80
15676940	conserved hypothetical protein [Neisseria meningitidis alpha275]	10,5				107,46	37,08		89	10,0 7
254673265	50S ribosomal protein L18 [Neisseria gonorrhoeae NCCP11945]	9,5	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	106,41	47,78	Pf00861	90	9,47
194099936	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [Neisseria meningitidis MC58]	36,1	catalytic activity; DNA		metabolic process	106,28	9,76	Pf01000; Pf01193; Pf03118	328	5,05

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15676095	aminotransferase AlaT [Neisseria meningitidis FAM18]	45,4	binding; protein binding catalytic activity		metabolic process	103,10	16,34	Pf00155; Pf00266; Pf01041; Pf01053; Pf01212 Pf01016	404	6,89
121635156	50S ribosomal protein L27 [Neisseria meningitidis MC58]	9,7	structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	101,48	38,89		90	10,0 5
15676241	hypothetical protein NMB1638 [Neisseria meningitidis MC58]	61,3	catalytic activity	membrane	metabolic process	101,39	4,60	Pf00884; Pf08019	544	7,65
15677487	sulfate adenylyltransferase subunit 2 [Neisseria meningitidis FAM18]	34,7	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	101,07	15,96	Pf01507	307	6,44
121634892	ribosomal protein S7 [Neisseria meningitidis H44/76]	15,1				99,62	23,88	Protein not found	134	10,2 7
427826234	methylcitrate synthase [Neisseria meningitidis FAM18]	42,8	catalytic activity	cytoplasm	metabolic process	95,94	14,06	Pf00285	384	7,11
121635436	cytochrome C1 family protein [Neisseria meningitidis M01- 240149]	29,4	metal ion binding	membrane		93,14	22,48	Pf02167	258	8,76
385341106	FrpC operon protein, partial [Neisseria meningitidis ATCC 13091]	18,5				89,78	25,48	Pf06901	157	7,11
304386613	single-strand binding protein [Neisseria meningitidis H44/76]	19,2	DNA binding		metabolic process	89,74	15,70	Pf00436	172	6,05
385852923	DNA gyrase/topoisomerase IV, A subunit, partial [Neisseria meningitidis M0579]	60,1				89,36	4,69	Protein not found	533	6,40
416187444	30S ribosomal protein S9 [Neisseria meningitidis MC58]	14,4	structural molecule	cytoplasm; ribosome	metabolic process	88,78	20,00	Pf00380	130	10,9 5

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
15677878	argininosuccinate synthase [Neisseria meningitidis FAM18]	49,6	activity catalytic activity; nucleotide binding; protein binding	cytoplasm	metabolic process	87,03	7,83	Pf00764	447	5,45
121635775	Na(+)-translocating NADH- quinone reductase subunit C [Neisseria meningitidis MC58]	27,6	catalytic activity; nucleotide binding	membrane	metabolic process; transport	84,56	18,99	Pf04205	258	8,00
15676472	argF [Neisseria meningitidis]	25,5	catalytic activity		metabolic process	83,84	16,81	Pf00185; Pf02729	232	5,58
3421244	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase [Neisseria meningitidis MC58]	49,6	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding		metabolic process	82,60	11,04	Pf00289; Pf01071; Pf02785; Pf02786; Pf07478	453	6,29
15677696	50S ribosomal protein L23 [Neisseria meningitidis MC58]	11,3	nucleotide binding; RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	82,04	20,19	Pf00276	104	9,85
15676071	lipoprotein [Neisseria meningitidis MC58]	13,7				82,03	9,17		120	8,54
15677086	30S ribosomal protein S19 [Neisseria meningitidis MC58]	10,4	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	78,92	25,00	Pf00203	92	10,7 0
15676073	glycine cleavage system protein	13,6		cytoplasm	metabolic	77,78	25,00	Pf01597	128	4,15

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	H [Neisseria meningitidis MC58]				process					
15676480	phosphate permease [Neisseria meningitidis MC58]	56,3	transporter activity	membrane	transport	74,45	6,30	Pf01384	524	8,90
15676292	immunoglobulin A1 protease family protein [Neisseria meningitidis NM2657]	107,9				74,36	2,73	Protein not found	989	9,28
421562026	30S ribosomal protein S15 [Neisseria meningitidis MC58]	10,4	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	74,11	20,22	Pf00312	89	11,18
15676513	50S ribosomal protein L14 [Neisseria meningitidis MC58]	13,4	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	72,09	14,75	Pf00238	122	10,58
15676079	cbb3-type cytochrome c oxidase subunit II [Neisseria meningitidis MC58]	22,5	catalytic activity; transporter activity		metabolic process	70,66	11,33	Pf02433	203	8,38
15677570	hypothetical protein NMC1229 [Neisseria meningitidis FAM18]	11,8				70,35	24,27		103	9,99
121635006	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc [Neisseria meningitidis FAM18]	20,9	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	69,21	17,89	Pf01386	190	7,14
121634651	glutathione synthase [Neisseria meningitidis H44/76]	35,0	catalytic activity; metal ion binding; nucleotide binding		metabolic process	68,45	12,26	Pf02951; Pf02955; Pf08443	318	6,58
385852838	arginine biosynthesis	19,7	catalytic		metabolic	67,65	15,22	Pf01960	184	5,59

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pl
254672133	bifunctional protein [Neisseria meningitidis alpha275]	26,7	activity		process	66,36	21,40	Pf00462; Pf00578; Pf08534	243	4,93
	antioxidant, AhpC/TSA family/glutaredoxin [Neisseria meningitidis H44/76]		antioxidant activity; catalytic activity		cellular homeostasis; metabolic process; regulation of biological process					
385853365	phospholipase A1 [Neisseria meningitidis M6190]	40,1		cytoplasm		66,17	11,70	Protein not found	359	8,51
416176854	inorganic pyrophosphatase [Neisseria meningitidis MC58]	19,8	catalytic activity; metal ion binding		metabolic process	64,22	23,16	Pf00719	177	4,86
15676541	50S ribosomal protein L16 [Neisseria meningitidis H44/76]	5,5				61,05	67,35	Protein not found	49	4,64
427826436	cysteine desulfurase [Neisseria meningitidis MC58]	44,6	catalytic activity		metabolic process	59,31	6,19	Pf00266; Pf00282; Pf01041; Pf01053; Pf01212	404	5,92
15677242	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III [Neisseria meningitidis alpha275]	32,4	catalytic activity; metal ion binding	membrane	metabolic process; transport	59,22	6,21	Pf00034	290	6,30
254673955	hypothetical protein NMB1417 [Neisseria meningitidis MC58]	30,5	catalytic activity		metabolic process	58,44	9,47	Pf03104; Pf10108	264	5,50
15677276	D-lactate dehydrogenase [Neisseria meningitidis 053442]	57,7	catalytic activity		metabolic process; transport	56,73	4,88	Pf01565; Pf09330	512	6,61
161869908	nucleotide-binding protein [Neisseria meningitidis 053442]	35,9	nucleotide binding	membrane		53,98	12,26	Pf03969	318	6,46
161870179	protein-export membrane	39,2	transporter		transport	53,74	5,71	Pf02355;	368	6,81

Accession	Description	MW [kDa]	Molecular Function	Cellular Component	Biological Process	Score	Coverage	Pfam IDs	# AAs	calc. pI
	protein SecD [Neisseria meningitidis alpha153]		activity					Pf03176		
254670810	50S ribosomal protein L22 [Neisseria meningitidis MC58]	11,9	RNA binding; structural molecule activity	cytoplasm; ribosome	metabolic process	52,85	16,51	Pf00237	109	10,29
15676074	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B [Neisseria meningitidis MC58]	51,9	catalytic activity; nucleotide binding		metabolic process	51,29	5,67	Pf02637; Pf02934	476	5,14
15677223	phosphoglyceromutase [Neisseria meningitidis FAM18]	25,9	catalytic activity		metabolic process	51,16	9,69	Pf00300	227	6,32
121635257	hypothetical protein NMCC_1859 [Neisseria meningitidis 053442]	18,0				48,93	15,85	Pf04391	164	4,73
161870777	major sodium/proline symporter [Neisseria meningitidis alpha153]	31,4	transporter activity	membrane	transport	41,48	5,74	Pf00474	296	9,17