TATIANE APARECIDA FERREIRA

Estudo do potencial adjuvante dos toxóides Stx1 e Stx2 de *Escherichia coli* em preparações com antígenos de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B em camundongos BALB/c

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

São Paulo
2009

TATIANE APARECIDA FERREIRA

Estudo do potencial adjuvante dos toxóides Stx1 e Stx2 de *Escherichia coli* em preparações com antígenos de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B em camundongos BALB/c

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

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientadora:
Profª. Drª. Elizabeth Natal De Gaspari

São Paulo
2009

RESUMO

FERREIRA, T. **Estudo do potencial adjuvante dos toxóides Stx1 e Stx2 de *Escherichia coli* em preparações com antígenos de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B em camundongos BALB/c.** 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As vacinas antimeningocócicas têm se demonstrado efetivas contra os sorogrupos A e C, no entanto ainda não existe vacina contra o sorogrupo B devido à similaridade entre a estrutura capsular do polissacáride B e o ácido polisiálico que faz parte do tecido cerebral humano, podendo levar à autoimunidade. O objetivo deste estudo foi investigar as propriedades adjuvantes dos toxóides Stx1 e Stx2 (STEC) de *Escherichia coli* , administrados em preparações antigênicas com vesículas de membrana externa nativa (NOMV) de *Neisseria meningitidis* B, comparando duas vias de imunização *prime-boost* ou intramuscular, em camundongos BALB/c com idade entre 6-8 semanas. A determinação dos níveis de anticorpos empregando a técnica de ELISA, mostrou elevadas concentrações de anticorpos IgG em soros de animais imunizados pela via intramuscular com Stx1+NOMV, mas não com NOMV, o que sugere que por esta via (intramuscular apenas) Stx1 possa ter atuado como adjuvante. No ensaio de *Immunoblotting*, soros de animais imunizados com Stx1+NOMV reconheceram maior número de antígenos de NOMV quando comparado ao grupo que recebeu Stx2+NOMV. O sistema *prime-boost* mostrou-se efetivo quando comparamos os níveis de anticorpos presentes no soro após a dose intramuscular (reforço), entretanto, não melhor do que quando utilizamos duas doses apenas pela via intramuscular. Este estudo poderá contribuir no desenvolvimento de tecnologias associadas a novas preparações antigênicas utilizando antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* B , empregando toxóides como adjuvantes.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis* B. Stx (STEC). Adjuvantes.

ABSTRACT

FERREIRA, T. **Study of the potential of adjuvants toxoids Stx1 and Stx2 of *Escherichia coli* on native outer membrane vesicle preparations of *Neisseria meningitidis* B in BALB/c mice.** 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The meningococcal vaccines have been shown to be effective against serogroups A and C, however there is still no vaccine against serogroup B. The capsular polysaccharide from serogroup B meningococci polysialic acid moiety mimetic of many human glycoproteins including the neural cell adhesion molecules and may lead to autoimmunity. This study aimed to investigate the adjuvant properties of toxoids Stx1 and Stx2 (STEC) from *Escherichia coli* and native outer membrane vesicles (NOMV) of *Neisseria meningitidis* B, comparing two ways of immunization prime-boost or only intramuscular in BALB/c mice. The results showed high concentrations of IgG antibodies in sera of animals immunized intramuscularly with Stx1+NOMV, suggesting that in this way may have Stx1 acted as an adjuvant. In the Immunoblotting assay, sera from animals immunized with Stx1+NOMV recognized more antigens of NOMV when compared to the group that received Stx2+NOMV. The prime-boost was effective however, no better than only two doses intramuscularly. This study may contribute to the development of new technologies and strategies against *N. meningitidis* B employing toxoids as adjuvants.

Keywords: *Neisseria meningitidis* B. Stx (STEC). Adjuvants.

1 INTRODUÇÃO

A doença meningocócica causada pela bactéria *N. meningitidis*, em muitos países tem sido causada principalmente pelo sorogrupo B, para o qual ainda não existe nenhuma vacina que seja totalmente eficaz. Muitos têm sido os esforços dos grupos de pesquisa para encontrar uma vacina ideal para ser administrada em humanos e que tenha proteção duradoura em adultos e seja imunogênica em crianças menores de 2 anos (HOLST, 2007; HEYDERMAN *et al*., 2006). A dificuldade para se chegar a uma vacina definitiva pode ser atribuída à grande capacidade que a bactéria tem de escapar dos mecanismos de defesa do sistema imune. O conhecimento de componentes antigênicos do microrganismo é de suma importância para estudo da resposta imune, contribuindo para a idealização de novas vacinas (DE GASPARI, 2008 ; ITO *et al.*, 2009).

A finalidade da vacinação é gerar uma resposta imune de longa duração e protetora contra a infecção. Adjuvantes são compostos que aumentam a resposta contra o antígeno e podem ser utilizados para vários propósitos como, por exemplo, reduzir a quantidade do antígeno necessário para indução de imunidade protetora, bem como, diminuir o número de doses (AGUILAR e RODRÍGUEZ, 2007). Contudo, apesar do grande avanço tecnológico, os compostos de alumínio ainda são os únicos de uso seguro para humanos (AGUILAR e RODRÍGUEZ, 2007). Há algum tempo as pesquisas em imunização têm-se focado no estudo de adjuvantes de mucosas e, os mais estudados até o momento são as enterotoxinas do *Vibrio cholerae* (CT) e a toxina termo-lábil (LT) da *Escherichia coli*, as quais estão relacionadas às toxinas da família AB5 e, apresentam diferentes propriedades imunológicas, aplicadas como adjuvantes ou ainda, acopladas a proteínas de diferentes antígenos (BAGLEY *et al.,* 2002; HARAKUNI *et al.,* 2005; NEGRI *et al.,* 2009). Entretanto, a aplicação destas toxinas ou suas subunidades e o uso como adjuvantes em humanos ainda requer maiores estudos para compreender o modo de ação de cada uma delas e também as propriedades imunomodulatórias (HOLMGREN *et al.*,2005).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado novas preparações antigênicas com potencial adjuvante (ITO *et al.*, 2009), entre estes, os toxóides Stx1 e Stx2

de cepas de *E. coli* (STEC) que secretam as toxinas de Shiga, associados às vesículas de membrana externa nativa de *Neisseria* meningitidis B em camundongos BALB/c adultos. Este trabalho analisa dois diferentes esquemas de imunização, um modelo *prime boost*, onde os animais recebem 4 doses pela via intranasal (*prime*) e uma dose reforço (*boost*) pela via intramuscular e outro, cujos animais recebem as preparações antigênicas apenas pela via intramuscular. O principal objetivo é verificar o potencial adjuvante dos toxóides de Stx. Ohmura-Hoshino e colaboradores (2005), demonstraram a atividade adjuvante de Stx1B (subunidade B) por meio da via intranasal, além de descrever a capacidade de Stx1 mutante ou Stx1B como ativadores de células dendríticas no NALT (Tecido linfóide associado à nasofaringe).

A busca por moléculas que aumentem a imunogenicidade de muitos antígenos é ainda mais significativa quando os estudos passam a ter interesse para a saúde publica. Desta maneira, este trabalho poderá contribuir no desenvolvimento de tecnologias associadas a novas preparações antigênicas para a meningite B, sugerindo o uso dos toxóides de Stx (STEC) como possíveis candidatos à adjuvantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Neisseria meningitidis*

O ser humano é o único hospedeiro natural de *N. meningitidis*, os quais são transmitidos por contato direto com secreções orais e nasais, tais como gotículas disseminadas pelo ar. Eles colonizam as membranas da nasofaringe e tornam-se parte da flora transitória do trato respiratório superior. Da nasofaringe, o organismo penetra na corrente sangüínea e dissemina para os sítios específicos, como as meninges ou articulações, ou para todo o corpo , por meio de infecção generalizada. Cerca de 5% dos indivíduos tornam-se portadores crônicos e servem como fonte de infecção para outros. A taxa de contaminação pode chegar a 35% em indivíduos que vivem em ambientes fechados, como recrutas. Isso explica a alta freqüência de epidemias de meningite nas forças armadas, antes do uso das vacinas (SOUZA e SEGURO, 2008).

A bactéria contém duas membranas - interna ou citoplasmática e externa, que são separadas por uma camada de peptidoglicano, o que confere rigidez à parede celular, determina a forma da bactéria e a protege da lise osmótica. Na membrana externa existem lipopolissacarídeos - LPS (endotoxinas) e diversas proteínas (OMPs), envolvidas na patogênese das Doenças Meningocócicas (DM). A membrana externa é revestida por uma cápsula de polissacarídeos essencial para a patogenicidade, tendo em vista que confere resistência contra a fagocitose e lise mediada por complemento, além de oferecer proteção contra agravos do meio ambiente. Há variações na composição do polissacarídeo, fator este que implica na patogenicidade do microrganismo e no desenvolvimento de imunidade. Assim sendo,o polissacarídeo da cápsula constitui o principal antígeno do microrganismo e determina a classificação da bactéria em 13 sorogrupos - A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W-135, X, Y e Z (MORLEY *et al.*, 2002).

A meningite bacteriana trata-se de um sério problema de saúde pública global, acometendo crianças, jovens e adultos, mas em situações epidêmicas, a doença pode atingir pessoas de todas as faixas etárias (CIVES, 2006). Anualmente ocorrem cerca de 500 mil casos com aproximadamente 50 mil

mortes, dentre os sobreviventes, entre 10 a 20% desenvolvem seqüelas neuronais permanentes como epilepsia, retardo mental ou surdez (GIRARD *et al.*, 2006).

A primeira descrição de uma epidemia de meningite cérebro-espinhal foi registrada em 1805 em Genebra na Suíça por Vieusseaux (*apud* REQUEJO, 2004), e o microrganismo causador desta doença, identificado no ano de 1887 por Anton Weichselbaum, um médico austríaco. Inicialmente foi denominada *Diplococcus intracellularis* e, posteriormente, inserida no gênero *Neisseria*. No Brasil, a meningite meningocócica foi observada pela primeira vez em São Paulo no ano de 1906.

2.1.1 Determinação dos sorogrupos, sorotipos e subtipos de meningococos

A identificação descritiva de uma cepa de meningococo se faz pela sequência - sorogrupo:sorotipo:subtipo. Cada sorogrupo de meningococo é definido pelo seu polissacarídeo capsular, tendo-os como importantes na toxicidade e poder imunogênico destes microrganismos. No meningococo B, o polissacarídeo é um homopolímero de ácido siálico, um derivado do ácido neuramínico (GIRARD *et al.*, 2006). Os sorogrupos A, B e C estão presentes em mais de 90% do material isolado de pacientes, sendo que, em situações epidêmicas no Brasil, 50 a 70% desses casos pertencem ao sorogrupo B (www.cve.saude.sp.gov.br). O sorogrupo A predomina na África, enquanto os sorogrupos B e C prevalecem em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, estando associados principalmente a surtos esporádicos (VIRJI, 1996).

A membrana externa contém entre 3 e 5 proteínas majoritárias subdividas em 5 diferentes classes estruturais, que aparentemente são relacionadas com seus pesos moleculares e são designadas de classes 1, 2, 3, 4 e 5. Classe 1 (43 a 47 kDa), Classe 2/3 (37 a 42 kDa), Classe 4 (33 a 34 kDa) e Classe 5 (26 a 30kDa). Todas as cepas de meningococos expressam a proteína de classe 2 ou 3, entretanto, nunca ambas simultaneamente. As proteínas de classes 1 e 5 são encontradas na maioria dos meningococos embora tenham sido observadas diferenças qualitativas e quantitativas em sua expressão. As proteínas de classe 1 porinas A (PorA) são empregadas na

definição de subtipo e as de classe 2/3 porinas B (PorB) na definição dos sorotipos (FRASCH *et al.*, 1985), figura 1.

As proteínas de classe 1 (PorA) são porinas que modulam a troca de íons entre o meio e a bactéria e se apresentam sob a forma de trímeros (POLLARD e FRASCH, 2001). As proteínas de classe 2 ou 3 (PorB), base da classificação dos meningococos em sorotipos, também são porinas que se apresentam sob a forma de trímeros. Estruturalmente, são bastante semelhantes às PorA, com regiões altamente variáveis nas seqüências de aminoácidos (VR1, VR2, VR3 e VR4). Porém, enquanto as PorA são cátion-seletivas, as PorB são ânion-seletivas (POLLARD e FRASCH, 2001). As proteínas de classe 4 cuja função ainda é desconhecida, possuem estrutura altamente conservada, estão presentes na maioria das cepas de meningococo e são capazes de induzir a produção de anticorpos de reatividade cruzada com outras proteínas de membrana externa (POLLARD e FRASCH, 2001). E, as proteínas de classe 5 são estruturalmente compostas por uma região semi-variável (SV) e duas regiões hipervariáveis (HV1 e HV2). Estudos têm demonstrado que estas proteínas são tão imunogênicas quanto as porinas (POOLMAN *et al.*, 1985).

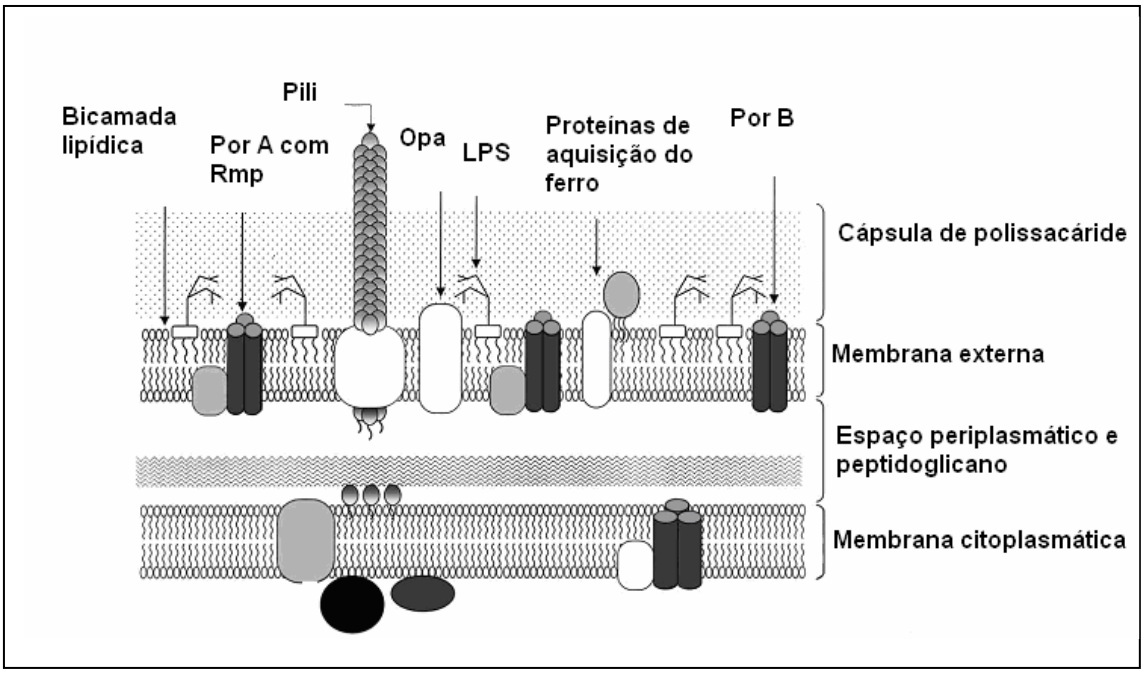

FIGURA 1. Proteínas de membrana externa de *N. meningitidis*, adaptado de MORLEY e POLLARD, 2002.

2.1.2 Estrutura Bacteriana

Dentre os fatores que alteram o metabolismo bacteriano estão os fisiológicos, que englobam a capacidade de síntese, fonte de energia, tensão de oxigênio, temperatura, pH, reprodução, e os bioquímicos, respiração, fermentação, putrefação e outros. Enquanto que entre os componentes enquadrados na virulência estão os fatores de adesão (cápsula, fímbria/fibrila, vesícula).

As fímbrias ou pili são apêndices de superfície, filamentosos que apresentam um importante papel na aderência de diferentes bactérias à superfície das mucosas (STEPHENS e FARLEY., 1991; FARLEY *et al.*, 1990).

A estrutura filamentosa protéica glicosilada da pili promove a adesão dos meningococos às células epiteliais e endoteliais humanas, que atravessam a cápsula polissacarídica e se ligam a receptores nas células nasofaríngeas, como por exemplo, no co-fator protéico ou CD46 (KÄLLSTRÖM_*et al.*, 1998; KÄLLSTRÖM_*et al.*, 2001; POLLARD e FRASCH, 2001). A presença de fímbrias está freqüentemente correlacionada com virulência, sendo necessária para a colonização e subseqüente infecção do hospedeiro (MEYER, 1999; STEPHENS e FARLEY., 1991; MEYER, 1991; FARLEY *et al.*, 1990; MEYER, 1990). Há estudos demonstrando a participação de fímbrias de cepas de meningococos encapsulados, no processo de aderência à superfície de mucosa e de eritrócitos (CRAVEN *et al.*, 1980; SALIT e MORTON, 1981; STEPHENS e FARLEY 1991; OLAFSON *et al.*, 1985). Microrganismos isolados de carreadores apresentaram maiores níveis de aderência que aqueles isolados de indivíduos doentes (CRAVEN *et al.*, 1980).

2.1.3 Vesículas de Membrana Externa (OMVs)

Zollinger e colaboradores (1972) verificaram que em cultura, os meningococos apresentam alto grau de autólise e vesiculação da membrana celular, produzindo vesículas (“blebs” – figura 2), denominando-as à época de complexo nativo (OMC), hoje denominadas de OMVs. Tais vesículas consistem numa membrana externa conservada, composta basicamente de Lipooligossacárides (LOS), Proteínas de Membrana Externa (OMPs) e

fosfolipídios, que mantém sua conformação organizacional estável, incluindo suas características físico-químicas (HOLST *et al.,* 2009). Provável que durante o processo infeccioso, estruturas vesiculares da membrana externa sejam naturalmente formadas e liberadas para o meio circulante (SOUZA e SEGURO, 2008) .

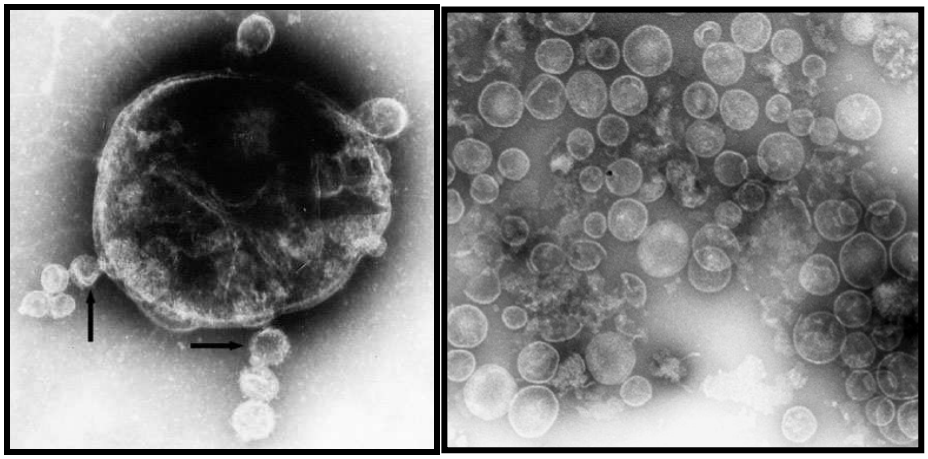

FIGURA 2. Microscopia eletrônica de um meningococo. As setas indicam as formações de vesículas de membrana externa ou "blebs" (SOUZA e SEGURO, 2008; HOLST *et al.,* 2009).

2.1.4 Lipopolissacarídeos (LPS)

A estrutura da membrana externa é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPSs). O LPS é considerado o maior fator de virulência de microrganismos Gram negativos, determinando efeitos biológicos, como por exemplo a atuação como adjuvante, que resultam na amplificação das reações inflamatórias (POLLMAN, 1995; VOGEL e FROSCH, 1999; VOGEL *et al.,* 1999).

Os glicolípides da membrana externa de bactérias que colonizam as superfícies das mucosas respiratórias, apresentam uma cadeia polissacarídica de menor extensão que aquelas observadas em microrganismos da mucosa intestinal (antígeno somático), sendo por isso denominado lipooligossacárides (LOS) e encontradas nos gêneros *Neisseria, Haemophilus e Bordetella* (GRIFFISS *et al.*, 1984). Constituem a base para a classificação de *N. meningitidis* em imunotipos (TZENG e STEPHENS, 2000). O arranjo do LOS na superfície celular é importante por influenciar diretamente na exposição de

proteínas de membrana externa (POOLMAN *et al.*, 1985, SAUKKONEN *et al.*, 1988).

2.1.5 Mecanismo de escape de *N. meningitidis*

Os meningococos desenvolveram um sofisticado mecanismo de escape do sistema imune para poder competir com as cepas de bactérias comensais do trato respiratório superior humano e, ocasionalmente invadir a circulação. Dentre os fatores deste mecanismo, podemos citar alguns componentes da membrana e da cápsula que estão envolvidos na adesão bacteriana à superfície dos tecidos, podendo também participar de mecanismos antifagocitários e de inibição ou inativação do complemento (VIDARSON *et al.*, 2001).

Um fator fundamental na patogênese da doença é a habilidade da bactéria aderir ao receptor da célula hospedeira, conhecido como CD46 (JOHANSSON *et al.*, 2003). O contato primário da bactéria com a célula hospedeira é mediado pelo pili IV (RYTKONEN *et al*., 2004), um tipo de pili que reconhece o receptor CD46 e estabelece uma comunicação crítica entre a bactéria e a célula alvo durante a fase inicial da infecção, o que sugere que o pili atua como um “órgão sensorial” do meningococo, estabelecendo o primeiro contato entre o patógeno e as células alvo (SOUZA e SEGURO, 2008).

O fator de virulência melhor definido do meningococo está relacionada com a estrutura dos polissacarídeos capsulares, das proteínas de membrana externa e dos lipooligossacarídeos (LEE, 1987) A cápsula polissacarídica propicia a entrada do microrganismo na circulação sanguínea, uma vez que, cepas não capsuladas são encontradas apenas na nasofaringe de portadores assintomáticos e não no sangue, além de resistir à fagocitose mediada pelos neutrófilos, aumentando a sua virulência (LEE, 1987). O meningococo se multiplica extracelularmente até que ocorra a produção de anticorpos específicos capazes de permitirem a opsonização, neutralizando a ação antifagocítica do polissacarídeo (FARIA e FARHAT, 1999).

Além disso, a bactéria apresenta a capacidade de modificação de seu lipooligossacáride (LOS) pela adição de um resíduo de acido siálico sobre o

terminal galactose, que é encontrado na estrutura lacto-N-neotetrose. Tal modificação faz com que a LOS “mascare” o reconhecimento do sistema imune, fazendo com que o microrganismo seja resistente à morte mediada pelo complemento, ou seja, torna-se soro-resistente (PARSONS *et al.,*1989).

Outro fator associado ao aumento da patogênese do meningococo, são as proteínas envolvidas na aquisição do ferro (IROMPS). Schryvers e Gonzalez (1990) verificaram que os membros da família Neisseriaceae desenvolveram um mecanismo para adquirir Ferro da transferrina humana usando proteínas que se ligam à transferrina (Tbp), lactoferrinas e grupo heme da hemoglobina do hospedeiro. A TBp é composta por 2 subunidades – Tbp1 e Tbp2, que apresentam limitada heterogeneidade antigênica. Estudos demonstram que as duas subunidades são imunogênicas, no entanto a subunidade 1 demonstra um maior potencial de indução de anticorpos com atividade bactericida. Estas proteínas são expressas na membrana externa dos meningococos quando estes se encontram em meio com limitação de Ferro (ZOLLINGER, 1997; POLLARD e FRASCH, 2001).

2.2 Transmissão

Cerca de 10% dos adolescentes e adultos são portadores assintomáticos da bactéria na orofaringe ("garganta") e podem transmitir a bactéria, mesmo sem adoecer. A bactéria é transmitida de uma pessoa para outra pela secreção respiratória (gotículas de saliva, espirro, tosse). Geralmente, após a transmissão, a bactéria permanece na orofaringe do indivíduo receptor por curto período e acaba sendo eliminada pelos próprios mecanismos de defesa do organismo. Desta forma, a condição de portador assintomático tende a ser transitória, embora possa se estender por períodos prolongados de meses a até mais de um ano (CIVES, 2006).

Em menos de 1% dos indivíduos infectados, contudo, a bactéria consegue penetrar na mucosa respiratória e atinge a corrente sanguínea levando ao aparecimento da doença meningocócica (DM). *A* invasão geralmente ocorre nos primeiros cinco dias após o contágio. Os fatores que determinam o aparecimento de doença invasiva ainda não são totalmente esclarecidos (CIVES, 2006).

2.3 Doença meningocócica

A Doença Meningocócica (DM) é uma infecção bacteriana aguda, rapidamente fatal, causada pela *Neisseria meningitidis*, podendo ocorrer em pessoas de qualquer faixa etária, porém é mais comum em crianças até cinco anos e mais rara em idosos. Esta bactéria pode causar inflamação nas membranas que revestem o sistema nervoso central (meningite) e infecção generalizada (*meningococcemia*) (CIVES, 2006). A DM tem distribuição global, podendo ocorrer surtos ocasionais e epidemias em qualquer país do mundo. As alterações climáticas influenciam a dinâmica da transmissão da doença meningocócica e as epidemias são mais freqüentes durante o inverno nas regiões temperadas e nas estações secas em regiões tropicais. Além disso, entre os sorogrupos a capacidade potencial de provocar epidemias é diferenciada (STEPHENS *et al.,* 2007). Os sorogrupos A e C têm a maior taxa de ataque, podendo chegar até 500 casos em cada 100 mil habitantes. Historicamente, o sorogrupo A foi o responsável pelas maiores epidemias e ainda atualmente provoca epidemias recorrentes no “cinturão da meningite” principalmente de novembro a junho, com redução do número de casos com o início da estação chuvosa. O sorogrupo B ocorre de forma endêmica em todos os continentes, inclusive nos países desenvolvidos, porém, durante uma epidemia, não ultrapassa 100 casos por 100 mil habitantes (CIVES, 2006).

No sentido de reduzir a incidência das DM, foram desenvolvidas vacinas polissacarídicas com os principais sorogrupos de meningococo; porém, não houve impacto na morbi-mortalidade, o que se deve ao fato dessas vacinas serem pouco imunogênicas em lactentes, crianças menores de dois anos e falhas ao induzir memória imunológica em todas as faixas etárias (BRICKS, 2002).

2.4 Epidemiologia

A África é a região com maior número de casos, principalmente na região semi-árida sub-Saariana, conhecida como “cinturão da meningite” que se estende do Senegal até a Etiópia, afetando cerca de 15 países. Os

sorogrupos prevalentes nesta região são A, C e casos esporádicos de W-135. Na América e Europa prevalecem os sorogrupos B e C, com histórico de casos do sorogrupo Y nos Estados Unidos (STEPHENS *et al.*, 2007)

Durante o ano de 1996 há relatos de que na região da África sub-saarina ocorreu uma epidemia (sorogrupo A) que atingiu aproximadamente 200 mil pessoas, dos quais ¾ dos casos ocorreu em indivíduos menores de 15 anos, causando cerca de 20 mil mortes (GIRARD *et al.,* 2006) .

Epidemias causadas pelo sorogrupo B tem se mostrado persistentes e têm incidência estimada em cerca de 20 mil – 80 mil casos por ano, dos quais aproximadamente 10% são fatais (GIRARD *et al.,* 2006). Na América do Norte este sorogrupo é responsável por aproximadamente 30 - 40% dos casos e, mais de 80% dos casos em países como Noruega, Alemanha, Dinamarca, Holanda e Nova Zelândia. Enquanto que a proporção de casos causados pelo sorogrupo C aumenta em outros países como, República Tcheca, Eslováquia, Grécia, Reino Unido e Canadá (BERRON *et al.,* 1998; RAMSAY *et al.,* 1997; ROSENSTEIN *et al.,* 1999). Nos Estados Unidos, os sorogrupos B, C e Y estão associados, em igual proporção a causa da doença meningocócica. Estima-se que ocorram aproximadamente 3 mil casos por ano, com índice de fatalidade em torno de 12%.

No Brasil a doença meningocócica tem sido monitorada desde que as epidemias dos sorogrupos A e C ocorreram entre os anos de 1971 e 1974. Em 1974 o número de casos excedeu a taxa de 179 casos por 100 mil habitantes. Em São Paulo, duas epidemias concomitantes aconteceram entre os anos de 1972 e 1974. Em 1972, 91% dos casos registrados pertenciam ao sorogrupo C e, em 1974 o sorogrupo A prevaleceu com 90% dos casos sorotipados à época. Durante o ano de 1974, estima-se que aproximadamente 1 em cada 300 habitantes de São Paulo desenvolveu a doença (ANDERSON, *et al*., 1998). Em 1975, a vacinação em massa, com os constituintes dos polissacárides A e C, pôs fim a esta brutal epidemia (GIRARD *et al*., 2006).

Ao longo da década de 80, o sorogrupo B passou a ser o mais frequente, sendo caracterizado em aproximadamente 83% dos isolados de meningococos. Em 1988, a incidência de meningites na Grande São Paulo foi de cerca de 4 para cada 100 mil habitantes (SACCHI *et al*., 1998). Nos últimos

20 anos foram notificados, no Brasil, cerca de 80 mil casos. Durante este período, os isolados de *N. meningitidis* foram caracterizados pela tipagem sorológica B:4P1.15. A década de 90 caracterizou-se por uma diminuição proporcional da presença do sorogrupo B e aumento progressivo da doença causada pelo meningococo sorogrupo C. Nos últimos 10 anos (Figuras 3 e 4) os relatos de DM causados pelo sorogrupo B têm apresentado declínio acentuado, diferente do que ocorre com o sorogrupo C, que tem mantido o número de casos da doença em ascensão, sendo então o sorogrupo prevalente nos casos de DM no estado.

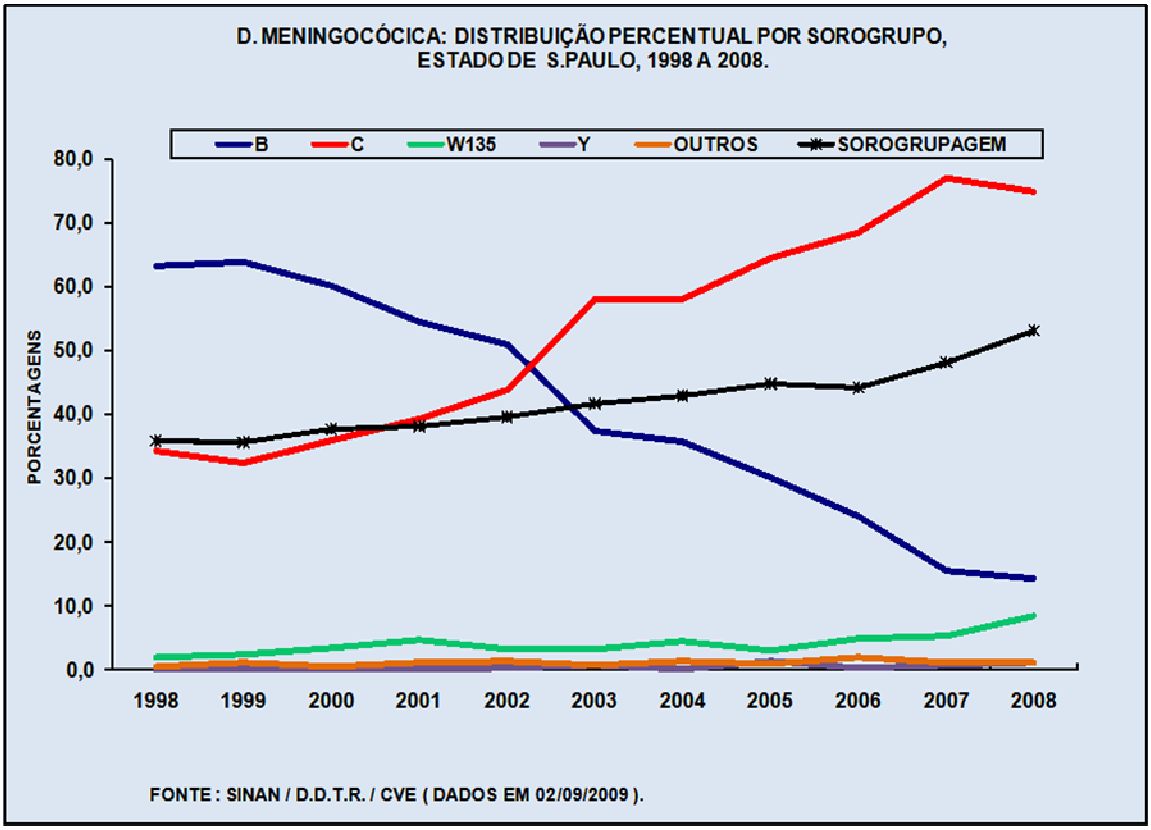

FIGURA 3. Doença meningocócica: distribuição percentual por sorogrupo no Estado de São Paulo de 1998 a 2008 (www.cve.saude.sp.gov.br).

SOROG	B		C		W135		Y		OUTROS		TOTAL	
ANO	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%	casos	%
1998	367	63,3	198	34,1	12	2,1	0	0,0	3	0,5	580	100,0
1999	373	63,9	189	32,4	14	2,4	1	0,2	7	1,2	584	100,0
2000	371	60,0	222	35,9	22	3,6	0	0,0	3	0,5	618	100,0
2001	247	54,5	178	39,3	22	4,9	1	0,2	5	1,1	453	100,0
2002	229	51,0	197	43,9	15	3,3	2	0,4	6	1,3	449	100,0
2003	163	37,4	253	58,0	14	3,2	3	0,7	3	0,7	436	100,0
2004	188	35,9	304	58,0	24	4,6	1	0,2	7	1,3	524	100,0
2005	154	30,1	329	64,4	16	3,1	7	1,4	5	1,0	511	100,0
2006	125	24,2	354	68,5	26	5,0	2	0,4	10	1,9	517	100,0
2007	84	15,7	412	77,0	29	5,4	4	0,7	6	1,1	535	100,0
2008	98	14,3	512	75,0	58	8,5	8	1,2	7	1,0	683	100,0
2009	44	13,8	249	77,8	22	6,9	5	1,6	0	0,0	320	100,0

OBS: Total = total de sorogrupados

FIGURA 4. Doença Meningocócica: casos e porcentagens por sorogrupo no Estado de São Paulo – 1998 – 2009 (www.cve.saude.sp.gov.br).

Tratando-se de dados epidemiológicos, é importante assinalar o percentual significativo de meningites bacterianas não especificadas, ou seja, que não têm definido sua etiologia, no universo das meningites notificadas. Todas as meningites são de notificação compulsória, à simples suspeita. Isto significa dizer que todos os casos suspeitos de meningite, independente do agente etiológico, devem ser notificados e investigados de forma oportuna e adequada. Há que se destacar a necessidade do estabelecimento de fluxos ativos pelo sistema de vigilância epidemiológica, a fim de assegurar a efetivação das medidas de prevenção e controle (DE GASPARI, 2004).

2.5 Desenvolvimento de Vacinas

Até o momento, um dos principais desafios na doença meningocócica tem sido à busca de uma vacina que ofereça proteção contra todos os grupos de meningococos patogênicos, seja efetiva para crianças menores de dois anos de idade, induza proteção de longa duração, além de induzir respostas

com altos títulos de anticorpos e, contudo, apresente segurança e boa tolerância (BRÖKER, 2003).

As vacinas já disponíveis contra *N. meningitidis* são sorogrupo específicas (A, C, Y e W135) e, portanto, baseadas na constituição do polissacáride. Estas vacinas infelizmente não induzem imunidade celular T – dependente e são pouco efetivas em crianças.

Os avanços biotecnológicos recentes, como a vacinologia reversa (VR), têm permitido o sequenciamento do genoma inúmeros microorganismos, mediante o uso de ferramentas de bioinformática que permitem identificar os antígenos mais prováveis a ser candidatos vacinais. Esta metodologia foi empregada com sucesso pela primeira vez por Rino Rappuoli (2000), com *Neisseria meningitidis* serogrupo B, abrindo o caminho para sua aplicação em outros patógenos (FERREIRA & PORCO, 2008). E, ainda que muitos tenham sido os esforços dos grupos de pesquisa, o desenvolvimento de uma vacina contra o sorogrupo B é ainda considerado remoto, mesmo depois do advento da vacinologia reversa (GIRARD *et al*., 2006).

2.5.1 Vacinas de polissacáride

O primeiro sucesso da vacinação contra *N. meningitidis* foi alcançado quando Gotschlich e colaboradores, em 1969 demonstraram a importância de anticorpos anti-polissacárides contra os sorogrupos A e C no soro de humanos. Embora as vacinas de polissacáride sejam fracamente imunogênicas em crianças menores de 2 anos, um estudo da vacina tetravalente (A, C, W135 e Y) na Arábia Saudita, envolvendo 423 crianças menores de 5 anos, demonstrou que 90% das crianças entre 2 - 4 anos apresentaram anticorpos bactericidas em resposta ao sorogrupo A, enquanto 60% delas estavam protegidas contra o sorogrupo W135. Contudo, crianças entre 6 -12 meses apresentavam 25% e 13% de proteção contra os respectivos sorogrupos (Al-MAZROU *et al.,* 2005). Contudo, estas vacinas deixam de induzir memória imunológica e na maioria dos casos provocam resposta IgM e IgG2, que não são bons ativadores de complemento e, ainda apresentam três pontos fracos principais: têm eficácia limitada em crianças menores de 2 anos de idade; conferem proteção por apenas dois a três anos; e não promovem a imunidade

na massa populacional (GIRARD *et al*., 2006). Em geral, o uso da vacina polissacarídica tem sido restrita para crianças maiores de dois anos.

2.5.2 Vacinas Conjugadas

Vacinas conjugadas têm sido desenvolvidas por Chiron e Wyeth, contra o sorogrupo C (MenC) utilizando o toxóide diftérico (CRM197), além do uso do toxóide tetânico, utilizada pela Baxter. Ambos toxóides foram utilizados nas duas preparações como proteínas carreadoras (GIRARD *et al.,* 2006). Estas vacinas foram introduzidas no Reino Unido em Novembro de 1999, no calendário vacinal, cujas imunizações são feitas no 2º, 3º e 4º mês, combinados com uma única dose entre 1-18 anos. O que tem sido interessante é a redução do número de casos de pessoas não vacinadas, o que está relacionado com a diminuição da circulação da bactéria na população (GIRARD *et al*., 2006). Atualmente esta vacina tem sido administrada no Reino Unido, para imunizar crianças e jovens (3 doses), embora existam evidências de que uma dose possa ser suficientemente protetora e, que duas doses reforço possam ser administradas em idade adulta (RICHMOND *et al.*, 2001).

Uma vacina conjugada bivalente MenA/C, utilizando o toxóide diftérico também foi proposta, entretanto, resultados demonstram que a mesma induz apenas memória para componentes do sorogrupo C (LEACH *et al.*, 1997; CHIPPAUX *et al.*, 2004).

2.5.3 Vacinas contra o sorogrupo B

As vacinas polissacarídicas A e C são relativamente eficazes, com comportamentos imunológicos distintos frente às faixas etárias, no entanto, para o sorogrupo B, responsável por aproximadamente 50% dos casos no mundo, a vacina constituída pelo polissacarídeo capsular é pouco imunogênica em crianças e adultos. Uma das prováveis causas dessa tolerância imunológica pode ser a reação cruzada deste antígeno com o polissacarídeo contendo ácido siálico, devido à sua semelhança com oligômeros α-(2→8) do ácido siálico ou ácido α-(2→8) N-acetil-neuramínico [α-(2→8) NeuNAc], presentes nos glicopeptídios humanos e no tecido cerebral de ratos (MOE e

GRANOFF, 2001; MOE *et al.,* 1999; PON *et al.,* 1997; HAMMERSCHMIDT et al., 1996; READ *et al.,* 1996; VOGEL *et al.,* 1996; FINNE *et al.,* 1987; FINNE *et al.,* 1983) , impedindo assim, que o polissacarídeo capsular do meningococo B seja reconhecido como substância estranha e, consequentemente, não induzir à produção de anticorpos.

As pesquisas visando uma vacina contra o sorogrupo B têm se concentrado nas vesículas da membrana externa (OMV) da *N. meningitidis* B e/ou dos lipopolissacarídeos (LPS), sendo estas, geralmente, sorotipo-específicas (GIRARD *et al.,* 2006). Vesículas de membrana externa nativa de *N. meningitidis* (NOMV) também têm recebido atenção especial da comunidade científica, uma vez que, estudos revelam sua característica imunogênica por apresentar todos os componentes da membrana externa. A primeira vacina baseada em OMV foi desenvolvida pelo Instituto Finlay, em Cuba e Instituto Nacional de Saúde Pública da Noruega, devido a surtos registrados nestes países. A vacina produzida pelo Finlay tem registro em 19 países e tem sido amplamente utilizada na América Latina, embora não tenha sido efetiva em crianças menores de 4 anos (GRANOFF, 1998a). A vacina norueguesa, monovalente para a cepa ET-5 clone (B:15:P1.7,16), contém material purificado de vesículas de membrana do meningococo B, adsorvido ao hidróxido de alumínio, enquanto que a vacina cubana VAMENGOC- BC, produzida a partir da cepa B:4:P1.19,15, contém 50 µg de polissacáride C e 50 µg de proteínas de membrana externa do meningococo B, é enriquecida com proteínas de alto peso molecular (65-95 kDa), integradas em proteolipossomos estáveis com 1% de LPS e adsorvida ao hidróxido de alumínio (*apud* REQUEJO, 1997). Estudos relacionados à vacinologia reversa indicam que possivelmente, a partir da identificação genética de novos antígenos, eles possam ser incluídos como potenciais candidatos vacinais (RAPPUOLI, 2001). Com a finalidade de identificar candidatos vacinais contra menB, Pizza e colaboradores, analisaram a sequência do genoma de uma cepa virulenta MC58. A maioria dos antígenos selecionados foi capaz de induzir proteção cruzada, contra cepas heterólogas, demonstrando que os antígenos identificados por análise dos programas de bioinformática eram possíveis candidatos para o desenvolvimento clínico de uma vacina contra menB (PIZZA *et al.*, 2000). Atualmente, alguns destes antígenos estão sendo testados em ensaios clínicos.

Desta maneira, verifica-se que ainda hoje, mesmo após o advento da vacinologia reversa, ainda há a necessidade de estudos relacionados ao desenvolvimento de uma vacina eficaz, imunogênica e capaz de induzir proteção duradoura contra o sorogrupo B.

2.5.4 Vacinas disponíveis no Brasil que podem auxiliar na prevenção da meningite

A vacina polissacarídica meningocócica protege contra os sorogrupos A e C de *N. meningitidis*, está indicada para indivíduos com 2 anos de idade ou mais e confere proteção durante cerca de três a cinco anos. Na rede pública do Estado de São Paulo, esta vacina tem uso indicado para controle de surtos/epidemias ou para grupos de risco (disponível nos CRIE – Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais).

A vacina meningocócica conjugada C protege contra o sorogrupo C de *N. meningitidis* que causa as formas graves da doença. Esta vacina foi aprovada para ser administrada a partir dos 2 meses de idade e induz proteção de longa duração. Na rede pública do Estado de São Paulo, está indicada para controle de surtos/epidemias e para os grupos de risco está disponível nos CRIE.

2.6 *Escherichia coli*

Escherichia coli foi descrita em 1885 como uma bactéria componente da microbiota intestinal por T. Escherich, que a denominou *Bacterium coli commune*. Apesar das evidências sugerirem uma forte associação entre *E.coli* e a diarréia infantil, somente na década de 1940 estes microorganismos foram reconhecidos como enteropatogênicos. Pertencem à família Enterobacteriaceae, integrado por bacilos gram negativos não esporulados, móveis ou imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos. Embora, seja a bactéria anaeróbia facultativa predominante na mucosa intestinal dos mamíferos saudáveis, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro, várias cepas, ao adquirir fatores de virulência específicos, tornaram-se potencialmente danosas (NATARO; KAPER, 1998). Segundo modificações do esquema apresentado por Kauffman (1947), o sorotipo

da espécie é baseado em O (somático) e H (flagelares) (KAPER, 2004), o que facilita os estudos de diferenciação de cepas virulentas e inócuas. O antígeno O é um polissacáride termoestável que faz parte do lipopolissacáride (LPS), presente na membrana externa da parede celular. Os antígenos flagelares H possuem natureza protéica e são termolábeis de forma a se tornarem inativos a temperatura superior a 100 ºC por 130 minutos. A mobilidade da *E. coli* está relacionada com a presença do flagelo na cepa bacteriana.

A adesão da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e infecção, é um fenômeno específico de reconhecimento entre o microrganismo e as células do hospedeiro que ocorre através das adesinas fimbriais e não fimbriais, com os receptores correspondentes na superfície celular. Desta forma, uma fímbria que confere patogenicidade a *E. coli* em uma espécie de animal poderá não o fazer para outra, e vice versa (SHARON e LIS, 1993). Outros fatores de virulência importantes na patogenia das enfermidades são as toxinas, as quais se classificam em endotoxinas e exotoxinas. Determinadas cepas de *E. coli* produzem toxinas protéicas que podem exercer um papel importante na patogenia das doenças, tais como: a enterotoxina termolábil (LT); a enterotoxina termoestável (ST); a verotoxina ou “Shiga-Like” toxina (VT, SLT, ou Stx) e o fator necrosante citotóxico (CNF) (GYLES, 1992).

Diferentes grupos de *E. coli*, são capazes de produzir diferentes infecções e síndromes, por apresentam mecanismos de patogênese específicos e sorotipos distintos. Isolados de *E. coli* diarreiogênica são usualmente classificados em seis diferentes categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroinvasora (EIEC) (NATARO e KAPER, 1998). Embora essa classificação continue sendo utilizada pela maioria dos autores, já se torna evidente que algumas categorias incluem patotipos bastante distintos. Kaper e colaboradores (2004) descrevem a subdivisão de EPEC e EAEC em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de E. coli produtora da toxina de Shiga (STEC).

2.6.1 As toxinas de Shiga produzidas por *E. coli*

Em 1977, Konowalchuck e colaboradores descreveram uma potente citotoxina, que foi capaz de gerar um irreversível efeito citotóxico em células Vero (células de rim de macaco verde africano), a qual foi inicialmente denominada verotoxina (VT). Quando verificou-se a neutralização destas toxinas em células Vero e HeLa (células humanas) por anti-soro específico para toxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, esta toxina produzida por *E. coli* passou a ser denominada Shiga-like toxin (SLT). A dupla nomenclatura (VT/SLT) adotada fez com que Calderwood *et al.,* (1996), propusessem uma nova nomenclatura, reconhecendo essas toxinas como pertencentes a família das toxinas Shiga (Stx). Nesta nomenclatura, as *E. coli* que portam o gene *stx* ou elaboram *stx* são referidas como STEC.

As toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2) são produtos dos genes *stx*1 e *stx*2 codificados por bacteriofágos lisogênicos que se integram no cromossomo da *E. coli*. Stx1, é neutralizado por anti-soro da citotoxina de *S. dysenteriae* 1, pois são consideradas idênticas (O'BRIEN, 1982). Stx2, é neutralizável apenas por anti-Stx2 (O'BRIEN, 1992). Os genes estruturais para Stx1 e Stx2 são encontrados em fagos lambda temperados, porém os genes para Stx2 já foram encontrados em cromossomos e apresentam 55 e 57% das seqüências genéticas de suas subunidades A e B idênticas, respectivamente (JACKSON *et al*., 1987 GRECO *et al*., 2004 MAKINO *et al*., 2001). Stx1 é considerada altamente conservada e suas variantes apresentam poucas diferenças nas suas seqüências genéticas, sem maiores conseqüências nas suas propriedades antigênicas e citotóxicas (MELTON-CELSA, 1998; DUFFY *et al*., 2000; THORPE *et al*., 2003). Ohmura-Hoshino e colaboradores (2003) clonaram e sequenciaram os genes que codificam duas novas variantes de Stx1, que diferem em 2 nucleotídeos e são 94% e 92% homólogas ao protótipo de subunidades A e B de Stx1, respectivamente. Contudo, até o momento ao menos 11 variantes de Stx2 já foram descritas e, embora heterogêneas são neutralizadas parcialmente por anti-soro Stx2 e podem ser identificadas por PCR (MENDES-LEDESMA, 2005).

O sequenciamento dos genes *stx, stx1* e *stx2* que codificam, respectivamente, as toxinas Shiga produzidas por *Shigella dysenteriae* do tipo

1, e Stx1 e Stx2 de STEC, permitiu elucidar e comparar as estruturas desses genes e a seqüência de aminoácidos dessas proteínas. Substituições de nucleotídeos encontradas nas seqüências de *stx1* e *stx2* em algumas STEC levaram a descrição de formas variantes destes genes. Na literatura, diferentes designações são utilizadas para os mesmos genes causando, muitas vezes, confusão (BÜRK *et al*., 2003; ZHANG *et* al.,2002; BASTIAN *et al*.,1998; PATON *et al*.,1995; PATON *et al*.,1993). No grupo das toxinas Stx1 poucas variantes foram descritas, destacando-se Stx1c (KUCZIUS *et al.,* 2004; ZHANG, *et al*., 2002).

A estrutura A-B da família das toxinas Shiga, holotoxinas de aproximadamente 70 kDa, é conservada entre seus membros. A subunidade A, de 32 kDa, pode ser clivada proteoliticamente, resultando em dois peptídios: A1 e A2, de 28 e 4 kDa, respectivamente, e que permanecem ligados por uma ligação dissulfeto. O peptídio A1 apresenta atividade enzimática (N-glicosidase), enquanto A2 tem a função de ligar a subunidade A ao pentâmero formado por cinco subunidades B idênticas, de 7,7 kDa cada. O pentâmero B liga a toxina ao receptor glicolipídico específico, presente na superfície da célula eucariótica, globotriasilceramida (Gb3) para Stx1 e Stx2 e globotetrasilceramida (Gb4) para Stx2e. Após a ligação, a holotoxina sofre endocitose por meio de depressões da membrana citoplasmática da célula eucariótica revestidas pela proteína clatrina (*coated pits*), formando uma vesícula selada com a holotoxina em seu interior. No citoplasma, esta vesícula pode se fundir com lisossomos, resultando na degradação da toxina. Porém, em células eucarióticas sensíveis a Stx, as vesículas são transportadas até o retículo endoplasmático via Complexo Golgiense, alcançando, então, o citosol. Durante este processo, a subunidade A é clivada pela enzima furina, gerando o fragmento cataliticamente ativo, A1 e o fragmento A2, cuja ligação dissulfeto é posteriormente reduzida. O fragmento A1 livre tem atividade RNA N-glicosidase, e interage com a unidade 60S do ribossomo. Ao remover um resíduo de adenina da subunidade 28S do rRNA eucariótico, A1 livre impede a ligação do amino-acil-RNA transportador a esta subunidade, e inibe a etapa de elongamento da síntese protéica e, assim, causa a morte celular (PATON e PATON, 1998). Habib e Jackson (1993) descreveram os operons de Stx: uma estrutura em comum, que consiste em uma única unidade transcricional,

codificando primeiro a subunidade A, seguida da subunidade B. A tradução da subunidade B ocorre de forma mais intensa do que a subunidade A, devido, aparentemente, à maior afinidade do ribossomo ao seu local de ligação, RBS (*ribossome binding site*), satisfazendo a relação estequiométrica A1:B5 da holotoxina.

Ambas as toxinas descritas apresentam citotoxicidade para células Vero e HeLa devido a presença dos receptores Gb3 e Gb4 em Vero e Gb3 em HeLa (JACEWICZ *et al*., 1989; KONOWALCHUK e SPEIRS, 1979). *In vivo* as células alvo são as endoteliais presentes nos rins, cérebro e submucosa do estômago e intestino dependendo da espécie infectada (MAINIL *et al.*, 1999)

2.6.2 Manifestações clínicas

As Stx são produzidas no cólon e, através da corrente sangüínea, são levadas aos rins, causando danos ao endotélio vascular e oclusão dos microvasos, através de uma combinação de toxicidade direta e indução local da inflamação local os quais podem levar a um largo espectro de doenças humanas, incluindo, diarréias, colite hemorrágica (CH) e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (PATON e PATON, 1998; ANDREOLI *et al.*, 2002). A CH caracteriza-se por espasmos abdominais e diarréia aquosa acompanhada por hemorragia. A SHU, descrita inicialmente por Gassner e colaboradores em 1955 é a principal complicação das infecções causadas por STEC (KARMALI *et al.,* 2004; KARMALI, 1989), podendo ocasionar anemia hemolítica, insuficiência renal aguda e trombocitopenia, podendo se estender para outros órgãos, incluindo o Sistema Nervoso Central (MENDES-LEDESMA, 2005)

2.6.3 Stx como adjuvante

Em 1991, Boyd e colaboradores imunizaram coelhos com a subunidade B de Stx e emulsificaram com adjuvante completo de Freund, após 4 semanas, os animais receberam uma dose reforço com o mesmo imunógeno emulsificado com adjuvante incompleto de Freund. Todas as imunizações foram administradas via subcutânea em múltiplas regiões do dorso dos animais. Após análise dos resultados, eles observaram que a subunidade B,

sozinha poderia constituir um imunógeno mais seguro e prático do que a holotoxina (AB5) detoxificada. Além disso, descreveram que embora exista uma homologia de 55 - 57%, aproximadamente, entre Stx1 e Stx2, o soro anti-Stx1 não era capaz de neutralizar as toxinas Stx2. E, concluíram que a subunidade B foi capaz de aumentar a resposta imune nos coelhos imunizados, agindo então como um bom imunógeno. Segundo Oloomi (2008), este foi um dos primeiros trabalhos que demonstrou a imunogenicidade de StxB.

Em 2004 Ohmura- Hoshino e colaboradores descreveram o uso de um derivado não tóxico de Stx como possível adjuvante de mucosa. Seus resultados apontaram Stx1B capaz de induzir resposta do tipo Th2, anticorpos de isótipo IgA (mucosa) e IgG (sistêmico), além de aumentar a regulação de moléculas co-estimulatórias, incluindo CD80, CD86 e CD40 em células dendríticas no NALT.

Oloomi e colaboradores em 2008, utilizaram camundongos BALB/c com idade de 6-7 semanas e administraram pela via subcutânea doses de Stx, utilizando a subunidade A, B e AB5 (com e sem o adjuvante completo ou incompleto de Freund's) e a dose desafio administrada via intraperitoneal. Os resultados demonstraram anticorpos sendo produzidos contra subunidades A e B. As maiores concentrações de anticorpos de isótipo IgG total foram observados em soros de camundongos imunizados com a subunidade A, enquanto que os resultados para holotoxina AB5 e subunidade B, revelaram-se similares quanto à estimulação da resposta imune. Entretanto, a análise das frações de IgG, mostrou que a subunidade B estimulou maiores concentrações de anticorpos de isótipo IgG1 e IgG2a quando comparado aos outros grupos. Seus resultados sugeriram a subunidade B como um efetivo adjuvante, estimulando a produção de anticorpos específicos e protetores.

Embora muitos resultados de diferentes grupos de pesquisa sugiram que Stx (holotoxina e suas sububidades A e B) possam atuar como adjuvantes de mucosa, sabe-se que se faz necessário muitos estudos sobre as propriedades destes antígenos, uma vez que, a toxina esta relacionada com a SHU. Os preparos vacinais devem ser seguros para serem administrados em humanos.

2.7 Adjuvantes

A palavra adjuvante deriva do latim "*adjuvare*", cujo significado é ajudar/auxiliar. É o nome genérico que se aplica a substâncias usadas em associação a antígenos, com o objetivo específico de auxiliar ou potencializar a resposta imunológica. Há mais de 80 anos os adjuvantes vêm sendo utilizados na imunologia experimental e na vacinação animal (DEL GIUDICE *et al.*, 2001), são compostos que visam aumentar a resposta imune para um determinado antígeno. Eles podem ser usados para diferentes propósitos, como por exemplo aumentar a imunogenicidade de antígenos altamente purificados ou recombinantes, ou ainda para reduzir a quantidade de antígeno inoculado por dose, bem como o número de imunizações, para aumentar a eficiência das vacinas em recém nascidos ou idosos, e até mesmo em pessoas imunocomprometidas (PETROVSKY e AGUILAR, 2004).

Os primeiros adjuvantes foram usados em 1925 por um pesquisador francês, Gaston Ramon, tendo o mesmo, demonstrado em estudos pioneiros que era possível aumentar artificialmente os níveis de antitoxinas tetânicas produzidas por uma vacina, ao adicionar-se à fórmula substâncias como amido, lecitina ou saponina (GATTÁS, 1996). Historicamente, os melhores componentes utilizados como adjuvantes de vacinas incluem extratos de parede bacteriana (principalmente de micobactérias), sais de metais (alumínio), endotoxinas e óleo mineral. Recentemente, lipossomos, interferon, complexos imunoestimulantes (ISCOMS) e citocinas têm sido utilizados ou investigados como potenciais adjuvantes (AGUILAR e RODRÍGUEZ, 2007; RESENDE *et al.*, 2004; COX e COULTER, 1997).

A natureza química dos adjuvantes utilizados até o momento é bastante variada e menciono alguns dos adjuvantes mais utilizados:

a) sais de alumínio, tais como fosfato e hidróxido de alumínio que são os únicos adjuvantes aprovados para uso clínico. São utilizados desde 1930 em humanos e também de uso veterinário. Induzem resposta Th2, são seguros de simples formulação e ainda apresentam baixo custo; b) combinação de sais de alumínio com monofosforil lipídio A (MPL), indutor de resposta Th1; c) combinação de monofosforil lipídio A (MPL) com QS-21 (uma fração purificada de extrato de saponina de *Quillarja saponina* e uma emulsão de óleo e água,

indutores de Th1 e Th2; d) bacterianos como LPS e MDP (muramildipeptídeo), um potente indutor de IL-1 e seus derivados hidrofílicos tendem a estimular a resposta Th2, enquanto derivados lipofílicos estimulam Th1. São ainda melhores quando associados a emulsões óleo/ água ou água/óleo, ou ainda associados a lipossomos, contudo têm sido associados a reações adversas verificadas na fase clínica; e) óleos minerais; f) óleos vegetais. Na categoria dos óleos minerais, vale uma referência especial ao adjuvante mais antigo e mais conhecido, o adjuvante de Freund, quer na forma "incompleta" que consiste em um óleo mineral livre de compostos aromáticos policíclicos quer em sua forma "completa" onde foi adicionada à sua fórmula original, uma bactéria inativada (*Mycobacterium tuberculosis ou Mycobacterium butyricum*) (AGUILAR e RODRÍGUEZ, 2007; RESENDE *et al*., 2004; HUNTER, 2002; COX e COULTER, 1997).

2.7.1 Adjuvantes licenciados para uso em humanos

Desde a década de 1920 quando os sais de alumínio foram utilizados pela primeira vez para aumentar a imunogenicidade das vacinas, os únicos adjuvantes licenciados para uso humano em larga escala são os sais de alumínio, hidróxido ou fosfato (DEL GIUDICE *et al.,* 2002). Um outro adjuvante, no ano de 1997 foi licenciado para uso em humanos em associação com a vacina influenza, o qual recebe a denominação de MF59, baseado na formação de uma emulsão água em óleo. Muitos são os motivos que tem levado a limitação da adoção de novos adjuvantes vacinais, pois os padrões de segurança das vacinas são elevados e não permitem os efeitos colaterais dos adjuvantes mais potentes, além disso os adjuvantes podem apresentam eficácia variável dependendo da via de imunização ou mesmo alterando a capacidade adjuvante, de acordo com o antígeno com o qual está sendo co-administrado (DEL GIUDICE *et al.,* 2002). Com as melhorias nas vacinas e o progresso nas técnicas de purificação de antígenos, há crescente necessidade de um adjuvante apropriado que efetivamente potencialize a resposta imune a antígenos fracamente imunogênicos. Entretanto, a absoluta segurança dos adjuvantes, na maioria das vezes, não pode ser garantida (HUNTER, 2002).

Uma série de novos adjuvantes tem sido estudada com resultados variáveis, sendo possível que novos produtos sejam introduzidos em futuro próximo. Portanto, a importância do conhecimento de novos adjuvantes e de seu mecanismo de ação, sobretudo daqueles de baixa toxicidade e baixo preço, poderá tornar-se uma alternativa de interesse biológico e econômico, para emprego em procedimentos de imunização/vacinação humana e/ou animal.

2.7.2 Adjuvantes de mucosa

Entre os compostos adjuvantes até hoje testados, dois se destacam pelo efeito sobre o sistema imune de mucosas, a toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae* e a toxina termo-lábil (LT), produzida por algumas linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). CT e LT são enterotoxinas do tipo A-B, isto é, toxinas que apresentam uma subunidade A, responsável pela atividade tóxica, e uma subunidade B, envolvida com a ligação a receptores específicos em células do hospedeiro. A subunidade A ou o pentâmero B não são citotóxicos por si só, pois embora a subunidade A seja enzimaticamente funcional, na ausência do pentâmero da subunidade B não há a associação com o sítio de ligação da célula hospedeira (SPANGLER, 1992). Embora LT e CT compartilhem aspectos estruturais e funcionais, essas moléculas apresentam diferenças bioquímicas e imunológicas importantes que se refletem em suas propriedades tóxicas e no potencial de utilização biotecnológica. LT e CT apresentam 80% de identidade em suas seqüências de aminoácidos; entretanto, CT possui maior toxicidade do que LT, em humanos (SIMÕES e FERREIRA, 2001). Além disso, em mamíferos, CT leva à ativação de respostas imunológicas que se caracterizam pela produção de IgE, o que pode resultar em choque anafilático em animais (reexpostos) à toxina. Por outro lado, LT induz respostas imunológicas sem o acúmulo de IgE, o que reduz o risco de efeitos colaterais. Por fim, LT age como adjuvante de mucosas e promove o aumento da resposta de anticorpos, local e sistêmica, para antígenos co-administrados por via oral ou nasal. Tais propriedades conferem à LT um grande potencial de utilização biotecnológica como adjuvante para vacinas,

sejam elas constituídas de antígenos purificados ou de microrganismos mortos ou atenuados, administradas por via de mucosas (DICKINSON e CLEMENTS, 1996). O efeito adjuvante de LT, assim como o de CT, ainda não está totalmente esclarecido, mas evidências experimentais demonstraram que as propriedades imunoestimuladoras dessa toxina podem envolver o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal, a ativação de células apresentadoras de antígenos por meio da maior expressão de moléculas co-apresentadoras de superfície e produção de citocinas que favorecem a produção de anticorpos sistêmicos e secretores. A atividade adjuvante de LTB e CTB ainda geram discussões na comunidade científica, uma vez que alguns autores afirmam que a atividade adjuvante depende da subunidade A da toxina, que é tóxica, o que inviabiliza a sua utilização em formulações vacinais destinadas a humanos (DE HAAN *et al*., 1998). Uma alternativa para superar essa dificuldade é a obtenção, através de técnicas de mutagênese sítio dirigida, de formas mutantes não tóxicas de CT e LT (SIMÕES e FERREIRA, 2001).

2.8 Imunologia de mucosa

A nasofaringe é o sítio de colonização dos meningococos e presumivelmente pode ser o sítio primário da invasão inicial para o desenvolvimento da infecção sistêmica (POLLARD e FRASH, 2001). Há provavelmente inúmeros fatores que contribuem para a integridade da barreira mucosa e previne a colonização e invasão. Contudo, estudos indicam que várias interações entre bactérias e as estruturas das células de superfície de mucosa estão envolvidas na aderência e invasão dos meningococos. A superfície da mucosa nasal possui cargas e hidrofobicidade que estão relacionadas com a adesão bacteriana, ou seja, mudanças desta carga podem resultar na adesão da bactéria (POLLARD e FRASH, 2001).

O tecido imune das mucosas é formado pelo tecido linfóide associado ao intestino (GALT), estruturas associadas com o broncoepitélio e trato respiratório baixo (BALT), tecido ocular, glândulas salivares, tonsilas e nasofaringe (NALT), laringe, trato urogenital, glândulas mamárias e produtos da lactação (LALT). O conjunto de todos estes sítios designam o tecido linfóide organizado (MALT) que consiste de áreas enriquecidas de células T e B, com

alta porcentagem de células B produtoras de sIgA e APCs necessárias à indução de respostas específicas (OGRA, 1996)

A resposta imunológica aos antígenos orais difere em alguns aspectos fundamentais da resposta a antígenos que ocorre em outros locais. As duas principais diferenças são os altos níveis de produção de IgA associada ao tecido mucoso e a tendência da imunização oral com antígenos protéicos a induzir tolerância em vez de ativação.

2.9 Estratégias de otimização de imunização

Na última década, os avanços tecnológicos de desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune.

A maioria dos patógenos, sejam eles bactérias, vírus, fungos ou parasitas, penetra no organismo humano através de uma superfície de mucosa, como as que limitam os tratos respiratório, ocular, gastrointestinal e geniturinário. Uma alternativa eficaz e econômica para o controle dessas doenças, além de medidas que possam melhorar as condições educacionais, sanitárias e higiênicas da população, seria o desenvolvimento de vacinas capazes de induzir proteção imunológica local, isto é, na própria superfície da mucosa em contato com o patógeno (SIMÕES e FERREIRA, 2001). Desta forma, a administração de vacinas pela via de mucosa tem sido frequentemente proposta como uma alternativa. Comparadas com as vias sistêmicas, as vias de mucosas possuem várias vantagens que incluem: fácil administração, não são invasivas e apresentam menor risco de contaminação (MESTECKYET *et al.,* 1987, OGRA, 1993).

A vacina oral contra a pólio (Sabin) é um exemplo bem sucedido de vacina de mucosas. Southam e colaboradores (2002), em estudos de instilações antigênicas pela via intranasal em camundongos, verificaram que além dos efeitos do volume da dose, o tempo da instilação, a posição do corpo do animal e o uso ou não de anestésicos também podem influenciar na resposta imune. Eyles e colaboradores (1999), pesquisando a resposta imune para diferentes volumes de toxóide tetânico, pela via intranasal em

camundongos, demonstraram que, sob certas condições (doses muito altas ou muito baixas de antígeno) podem não induzir resposta imune e, são conhecidos respectivamente, como zona de alta ou baixa tolerância adquirida, demonstrando que doses de antígenos em concentrações não ideais podem inibir a resposta imune.

Contanto, embora as vacinas orais ou nasais apresentem uma série de vantagens em relação às vacinas de administração parenteral, o número de vacinas de mucosas atualmente disponíveis para uso no homem ou em animais domésticos ainda é muito limitado (SIMÕES e FERREIRA, 2001). Desta forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas de mucosas mais seguras e eficazes é uma prioridade para a saúde pública mundial.

7 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu concluir que:

- O sistema *prime-boost* é efetivo no que diz respeito a mimetizar as características naturais de colonização de *N. meningitidis*, aumentando a concentração de anticorpos presentes no soro após imunização intramuscular;
- A imunização intramuscular com duas doses do preparo antigênico Stx1+NOMV foi melhor do que Stx2+NOMV;
- Os toxóides Stx1 e Stx2 atuam de maneira distinta de acordo com a via de imunização;
- Stx1 atua como adjuvante;
- Comparando os esquemas de imunização, os grupos de animais que receberam apenas doses intramuscular produziram maiores concentrações de anticorpos IgG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Al-MAZROU, Y.; KHALIL, M.; BORROW, R.; BALMER, P.; BRAMWELL, J.; LAL, G. *et al*. Serologic responses to ACYW135 polysaccharide meningococcal vaccine in Saudu children under 5 years of age. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, p. 2932-2939, 2005.

ANDERSON, M.S.; GLODÉ, M.P.; SMITH, A.L. Meningococcal disease. In: FEIGI, R.D.; CHERRY, J.D. **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. 4th edn. Philadelphia, P.A.: W.B. Saunders, 1998. p. 1143-1156.

ANDREOLI, S.P.; TRACHTMAN, H.; ACHESON, D.W.; SIEGLER, R.L; OBRIG, T.G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. **Pediatr. Nephrol.**, v. 17, n. 4, p. 293-298, 2002.

AGUILAR, J.C.; RODRÍGUEZ, E.G. Vaccine adjuvants revisited. **Vaccine**, v. 25, p. 3756-3762, 2007.

ARAKAWA, T.; TSUBOI, T.; KISHIMOTO, A.; SATTABONGKOT, J.; SUWANABUN, N.; RUNGRUANG, T.; MATSUMOTO, Y.; TSUJI, N., HISAEDA H.; STOWERS, A.; SHIMABUKURO, I.; SATO, Y.; TORII, M. Serum antibodies induced by intranasal immunization of mice with *Plasmodium vivax* Pvs25 co-administered with cholera toxin completely block parasite transmission to mosquitoes. **Vaccine**, v. 21, n. 23, p. 3143-3148, 2003.

BAGLEY, K.C.; ABDELWAHAB, S.F.; TUSKAN, R.G.; FOUTS, T.R.; LEWIS, G.K. Cholera Toxin and Heat-Labile Enterotoxin Activate Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Dominantly Inhibit Cytokine Production through a Cyclic AMP-Dependent Pathway**. Infect. Immun.**, v. 70, p. 5533-5539, 2002.

BASTIAN, S.; CARLE, I.; GRIMONT, F. Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of stx genes in Shiga toxin producing *Escherichia coli.* **Res. Microbiol.**, v. 149, n. 1, p. 457-472, 1998.

BERRON, S.; DE LA FUENTE, L.; MARTIN, E.; VAZQUEZ, J.A. Increasing incidence of meningococcal disease in Spain associated with a new variant of serogroup C. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, n. 2, p. 85-86, 1998.

BISHOP, N.C.; WALKER, G.J.; BOWLEY, L.A.; EVANS, K.F.; MOLYNEUX, K.; WALLACE, F.A.; SMITH, A.C. Lymphocyte responses to influenza and tetanus toxoid in vitro following intensive exercise and carbohydrate ingestion on consecutive days. **J. Appl. Physiol.**, v. 99, n. 4, p. 1327-1335, 2005.

BOYD, B.; RICHARDSON, S.; GARIEPY, J. Serological responses to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B

---

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

subunit is a vaccine candidate to counter action of the toxin. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 3, p. 750-757, 1991.

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

BRÖKER, M. Development of new vaccines against meningococcal disease. **Arzneimittelforschung**, v. 53, n. 12, p. 805-813, 2003.

BÜRK, C.; DIETRICH, R.; AÇAR, G.; MORAVEK, M.; BÜLTE, M.; MÄRTLBAUER E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2106-2112, 2003.

CALDERWOOD, S. B. *et al*. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News**, v. 62, p. 118-119, 1996.

CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. São Paulo: Livraria e Editora Revinter, 2001. 260p.

CAUGANT, D.A.; NICOLAS, P. Molecular surveillance of meningococcal meningitis in Africa. **Vaccine**, v. 25, p. A8-11, 2007. Suppl. 1.

CENTRO DE INFORMAÇÃO EM SAÚDE PARA VIAJANTES; CASTIÑEIRAS, T.M.P.P. *et al*. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/dm/dm-iv.html>. Acesso em: 17 Out. 2008.

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

CHIPPAUX, J.P. *et al*. Immunogenicity, safety, and memory of different schedules of Neisseria meningitides A/C diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants in Niger. **Vaccine**, v. 22, n. 25-26, p. 3303-3311, 2004.

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

CRAVEN, D.E.; PEPPLER, M.S.; FRASCH, C.E.; MOCCA, L.F.; MCGRATH, P.P.; WASHINGTON, G. Adherence of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and carriers to human buccal epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 142, n. 4, p. 556-568,1980.

CUELLO, M.; CABRERA, O.; DEL CAMPO, J.M.; PARAJÓN, E.; SOTOLONGO, F.; CAMARAZA, M.A.; ARNET, A.; SUÁREZ, M.; PÉREZ, O. Mucosal immune responses to meningococcal C polysaccharide-protein conjugate in mice. **Vaccine**, v. 24, p. S2-72-3, 2006. Suppl. 2.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Meningites/Doenças meningocócicas. Disponível em:

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_meni.html>. Acessos em: 28 Out. 2008; 13 de Nov. 2008; 15 Dez. 2008; 26 de Mai 2009; 23 de Set. 2009.

DE GASPARI, E.N. Vacina nasal para *Neisseria meningitidis* B: Importância das Pesquisas utilizando novas metodologias para o preparo de vacinas. **Bol. Epidem. Paulista (BEPA)**, v. 5, p. 1-9, 2004.

DE GASPARI, E.N. The use of monoclonal antibodies to *Neisseria lactamica* in an antigen selection to *Neisseria meningitides* B vaccine. **Hybridoma,** Larchmt, v.27, n. 5, p. 387-393, 2008.

DEL GIUDICE, G.; PODDA, A.; RAPPUOLI, R. What are the limits of adjuvanticity? **Vaccine**, v. 15, p. S38-41, 2001. Suppl. 1.

DICKINSON, B.L.; CLEMENTS, J.D. Use of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin as an oral adjuvant. In Kiono, H, Ogra, PL, e McGhee, JR (Ed.). **Mucosal Vaccines**, p. 73-87,1996.

DOUCE, G.; GIANNELLI, V.; PIZZA, M.; LEWIS, D.; EVEREST, P.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G. Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4400-4406, 1999.

DUFFY, G.; RIORDAN, D.C.; SHERIDAN, J.J.; CALL, J.E.; WHITING, R.C.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A. Effect of pH on survival, thermotolerance, and verotoxin production of *Escherichia coli* O157:H7 during simulated fermentation and storage. **J. Food Prot.**, v. 63, n. 1, p. 12-18, 2000.

EYLES, J.E.; WILLIAMSON, E.D.; ALPAR, H.O. Immunological responses to nasal delivery of free and encapsulated tetanus toxoid: studies on the effect of vehicle volume. **Int. J. Pharm.**, v.189, n. 1, p. 75-79, 1999.

FARIA, S.M.; FARHAT, C.K. Bacterial meningitis - diagnosis and treatment. **J. Pediatr.,** Rio Janeiro, v. 75, p. S46-56, 1999. Suppl. 1.

FARLEY, M.M.; STEPHENS, D.S.; KAPLAN, S.L.; MASON, E.O. JR. Pilus- and non-pilus-mediated interactions of *Haemophilus influenzae* type b with human erythrocytes and human nasopharyngeal mucosa. **J. Infect. Dis.**, v.161, n. 2, p. 274-280, 1990.

FEAVERS, I.M.; PIZZA, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 27,:B42-50, 2009. Suppl. 2.

FINNE, J.; BITTER-SUERMANN, D.; GORIDIS, C.; FINNE, U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. **J. Immunol.**, v.138, n. 12, p. 4402-4407,1987.

FINNE, J.; LEINONEN, M.; MÄKELÄ, P.H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. **Lancet**, v. 2, n. 8346, p. 355-357, 1983.

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

GATTÁS, V.L. **Avaliação da cobertura vacinal e uso de serviços de saúde para vacinação na região Sudoeste da Grande São Paulo, 1989-1990**. Dissertação (Mestrado) - Depto. de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1996.

GIRARD, M.P.; PREZIOSI, M.P.; AGUADO, M.T.; KIENY, M.P. A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. **Vaccine**, v. 24, p. 4692-4700, 2006.

GOTSCHLICH, E.C.; GOLDSCHNEIDER, I.; ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. **J. Exp. Med.**, v. 129, n. 6, p. 1385-1395, 1969.

GRANOFF, D.M.; GUPTA, R.K.; BELSHE, R.B.; ANDERSON, E.L. Induction of of immunologic refractoriness in adultus by meningococcal C polysaccharide vaccination. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 3, p. 870-874, 1998a.

GRANOFF, D.M.; MASLANKA, S. E.; CARLONE, G. M.; PLIKAYTIS, B.D.; SANTOS, G. F.; MOKATRIN, A.; RAFF, H.V. A Modified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Antibody Responses to Meningococcal C Polysaccharide That Correlate with Bactericidal Responses. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 479-485, 1998b.

GRECO, K.M.; MCDONOUGH, M.A.; BUTTERTON, J.R. Variation in the Shiga toxin region of 20th-century epidemic and endemic *Shigella dysenteriae* 1 strains. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 2, p. 330-334, 2004.

GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. Can. **J. Microbiol.**, v. 36, p. 734-746, 1992.

HABIB, N.F.; JACKSON, M.P. Roles of a ribosome-binding site and mRNA secondary structure in differential expression of Shiga toxin genes. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 3, p. 597-603, 1993.

HALPERIN, S.A.; MCDONALD, J.; SAMSON, L.; DANZIG, L.; SANTOS, G.; IZU, A.; SMITH, B.; MACDONALD, N. Simultaneous administration of meningococcal C conjugate vaccine and diphtheria-tetanus-acellular pertussis-inactivated poliovirus-*Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in children: a randomized double-blind study. **Clin. Invest. Med.**, v. 25, n. 6, p. 243-251, 2002.

HALPERIN, S.A.; LANGLEY, J.M.; HESLEY, T.M.; ZAPPACOSTA, P.S.; RADLEY, D.; SMITH, B.; HOFFENBACH, A.; BOSLEGO, J.; SILBER, J.L. Safety and immunogenicity of two formulations of a hexavalent diphtheria-tetanus-acellular pertussis-inactivated poliovirus-*Haemophilus influenzae* conjugate-hepatitis B vaccine in 15 to 18-month-old children. **Hum. Vaccine**, v. 1, n. 6, p. 245-250, 2005.

HAMMERSCHMIDT, S.; MULLER, A.; SILLMANN, H.; MUHLENHOFF, M.; BORROW, R.; FOX, A.; *et al.* Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (siaD): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. **Mol. Microbiol.**, v. 20, n. 6, p. 1211-1220, 1996.

HANEBERG, B.; ROLF, D.; WEDEGE, E.; HØIBY,E.A.; HAUGEN, I.L.; OFTUNG, F.; ANDERSEN, S.R.; *et al*. Intranasal Administration of a Meningococcal Outer Membrane Vesicle Vaccine Induces Persistent Local Mucosal Antibodies and Serum Antibodies with Strong Bactericidal Activity in Humans. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 4, p. 1334-1341,1998.

HARADA, H.; NISHIKAWA, F.; HIGASHI, N.; KITA, E. Development of a mucosal complex vaccine against oral *Salmonella* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, n. 12, p. 891-905, 2002.

HARAKUNI, T.; SUGAWA, H.; KOMESU, A.; TADANO, M.; ARAKAWA, T. Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5654-5665, 2005.

HEYDERMAN, R.S.; DAVENPORT, V.; WILLIAMS, N.A. Mucosal immunity and optimizing protection with meningococcal serogroup B vaccines. **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 120-124, 2006.

HOLMGREN, J.; ADAMSSON, J.; ANJUÈRE, F.; CLEMENS, J.; CZERKINSKY, C.; ERIKSSON, K. *et al*. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. **Immunol. Lett.**, v. 97, n. 2, p. 181-188, 2005.

HOLST, J.; MARTIN, D.; ARNOLD, R.; HUERGO, C.C.; OSTER, P.; O'HALLAHAN, J.; ROSENQVIST, E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 24, n. 27, p. B3-12, 2009. Suppl. 2.

HOLST, J. Strategies for development of universal vaccines against meningococcal serogroup B disease: the most promising options and the challenges evaluating them. **Hum. Vaccine**, v. 3, n. 6, p. 290-294, 2007.

HUNTER, R.L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. **Vaccine**, v. 20, p. S7-12, 2002. Suppl. 3. Review.

ITO, A.Y. *et al*. Homologous prime-boost strategy in neonate mice using *Neisseria lactamica*. **Vaccine**, v.26, n. 25-26, p. 3422-3428, 2009.

JACEWICZ, M.; FELDMAN, H.A.; DONOHUE-ROLFE, A.; BALASUBRAMANIAN, K.A.; KEUSCH, G.T. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XIV. Analysis of Shiga toxin receptors on cloned HeLa cells. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 5, p. 881-889, 1989.

JACKSON, M.P.; NEWLAND, J.W.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. **Microb. Pathog.**, v. 2, n. 2, p. 147-153, 1987.

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

JONES, H.W.; McKUSICK, V.A.; HARPER, P.S.; WUU, K.D. The HeLa cell and reappraisal of its origin. **Obstet. Gynecol.**, v. 38, p. 945-949, 1971.

KÄLLSTRÖM, H.; BLACKMER GILL, D.; ALBIGER, B.; LISZEWSKI, M.K.; ATKINSON, J.P.; JONSSON, A.B. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. **Cell. Microbiol.**, v. 3, n. 3, p. 133-143, 2001.

KÄLLSTRÖM, H.; ISLAM, M.S.; BERGGREN, P.O.; JONSSON, A.B. Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 34, p. 21777-21782, 1998.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. **Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004. Review.

KAPER, J.B. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, n. 1, p. 103-108, 1998. Review.

KARMALI, M.A. *Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, n. 1, p. 15-38, 1989. Review.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli, 1985*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, n. 5, p. 775-782, 2004.

KATIAL,R.K.; BRANDT, B.L.; MORAN, E.E.; MARKS, S.; AGNELLO, V.; ZOLLINGER, W.D. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 702-707, 2002.

KENDE, M.; DEL GIUDICE, G.; RIVERA, N.; HEWETSON, J. Enhancement of intranasal vaccination in mice with deglycosylated chain A ricin by LTR72, a novel mucosal adjuvant. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2213-2221, 2006.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS J.I. Response of various cell lines to *Escherichia coli* toxic products. **Can. J. Microbiol.**, v. 25, n. 3, p. 335-339, 1979.

KUCZIUS, T.; BIELASZEUWSKA, M.; FRIEDRICK, A.W.; ZHANG, W. A rapid method for the discrimination of genes enconding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 48, n. 7, p. 515-521, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 15, p. 680-685, 1970.

LEACH, A. *et al*. Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. **J. Infect. Dis.**, v. 175, n. 1, p. 200-204, 1997.

LEE, C.J. Bacterial capsular polysaccharides--biochemistry, immunity and vaccine. **Mol. immunol.**, v. 24, n. 10, p. 1005-1019, 1987.

MAINIL, J.G.; JACQUEMIN, E.; POHL, P.; FAIRBROTHER, J.M.; ANSUINI, A.; LE BOUGUÉNEC, C. *et al*. Comparison of necrotoxigenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. **Vet. Microbiol.**, v. 70, n. 1-2, p. 123-135, 1999.

MAKINO, S.; WATARAI, M.; TABUCHI, H.; SHIRAHATA, T.; FURUOKA, H.; KOBAYASHI, Y.; TAKEDA, Y. Genetically modified Shiga toxin 2e (Stx2e) producing *Escherichia coli* is a vaccine candidate for porcine edema disease. **Microb. Pathog.**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2001.

MARCATO, P.; MULVEY, G.; READ, R.J.; VANDER HELM, K.; NATION, P.N.; ARMSTRONG, G.D. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 3, p. 435-443, 2001.

MELTON-CELSA, A.R.; ROGERS, J.E.; SCHMITT, C.K.; DARNELL, S.C.; O'BRIEN, A.D. Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain. **Jpn J. Med. Sci. Biol.**, v. 51, p. S108-14, 1998. Suppl. 1.

MENDES-LEDESMA, M.R.; ROCHA, L.B.; BUERIS, V.; KRAUSE, G.; BEUTIN, L.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R.; ELIAS, W.P.; PIAZZA, R.M. Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Microbiol. Immunol.**, v.52, n. 10, p. 484-491, 2008.

MENDES-LEDESMA, M.R.B. **Avaliação de métodos imunossorológicos na detecçãpo de isolados de *Escherichia coli* produtora da toxina de shiga**

(STEC). Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo da USP, São Paulo, 2005.

MESTECHY, J.; CZERKINSKY, C.; RUSSELL, M.W.; BROWN, T.A.; PRINCE, S.J.; MOLDOVEANU, Z.; JACKSON, S.; MICHALEK, S.M.; McGhee, J.R. Induction and molecular properties of secretory and serum IgA antibodies specific for environmental antigens. **Ann. Allergy**, v. 59, p. 54-59, 1987. Review.

MEYER, T.F. Pathogenic neisseriae: complexity of pathogen-host cell interplay. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, n. 3, p. 433-441, 1999. Review.

MEYER, T.F. Evasion mechanisms of pathogenic Neisseriae. **Behring Inst. Mitt.** , v. 88, p. 194-199, 1991. Review.

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

MOE, G.R.; GRANOFF, D.M. Molecular mimetics of *Neisseria meningitidis* serogroup B polysaccharide. **Int. Rev. Immunol.**, v. 20, n. 2, p. 201-220, 2001.

MOE, G.R.; TAN, S.; GRANOFF, D.M. Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 26, n. 3-4, p. 209-226, 1999. Review.

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

SAUNDERS, N.B.; SHOEMAKER, D.R.; BRANDT, B.L.; MORAN, E.; LARSEN, T.; ZOLLINGER, W.D. Immunogenicity of Intranasally Administered Meningococcal Native Outer Membrane Vesicles in Mice. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 113-119, 1999.

NATARO, J.P.; STEINER, T.; GUERRANT, R.L. Enteroaggregative *Escherichia coli.* **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 251-261, 1998. Review.

NEGRI, D.R.M.; PINTO, D.; VENDETTI, S.; PATRIZIO, M.; SANCHEZ, M.; RICCOMI, A.; RUGGIERO, P.; DEL GIUDICE, G.; DE MAGISTRIS, M.T. Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin, but Not Their Nontoxic Counterparts, Improve the Antigen-Presenting Cell Function of Human B Lymphocytes. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1924-1935, 2009.

O'BRIEN, A.D.; TESH, V.L.; DONOHUE-ROLFE, A.; JACKSON, M.; OLSNES, S.; SANDVIG, K.; LINDBERG, A.A.; KEUSCH, G.T. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.180, p. 65-94, 1992. Review.

O'BRIEN, A.D.; LAVECK, G.D.; THOMPSON, M.R.; FORMAL, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 146, n. 6, p. 763-769, 1982.

OGRA, P.L. Mucosal immunity: some historical perspective on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 81, n. 1, p. 23-33, 2003.

OGRA, P.L. Mucosal immunoprophylaxis: An Introductory overview. **Mucosal Vaccines**, p. 3-13, 1996.

OHMURA-HOSHINO, M.; YAMAMOTO, M.; TOMIYAMA-MIYAJI, C.; YUKI, Y.; TAKEDA, Y.; KIYONO, H. Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4088, 4097, 2005.

OHMURA-HOSHINO, M.; YAMAMOTO, M.; YUKI, Y.; TAKEDA, Y.; KIYONO, H. Non-toxic Stx derivatives from Escherichia coli possess adjuvant activity for mucosal immunity. **Vaccine,** v. 22, n. 27-28, p. 3751-3761, .2004.

OHMURA-HOSHINO, M.; HO, S.T.; KURAZONO, H.; IGARASHI, K.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y. Genetic and immunological analysis of a novel variant of Shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 10, p. 717-725, 2003.

OLAFSON, R.W.; MCCARTHY, P.J.; BHATTI, A.R.; DOOLEY, J.S.; HECKELS, J.E.; TRUST, T.J. Structural and antigenic analysis of meningococcal piliation. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 2, p. 336-342, 1985.

OLOOMI, M.; BOUZARI, S.; AJDARY, S. Immune Responses of Mice Immunized with Active Recombinant Shiga Toxin and Its Derivatives. Iran J. **Allergy Asthma Immunol.**, v. 7, n. 2, p. 53-60, 2008.

PARSONS, N.J.; ANDRADE, J.R.; PATEL, P.V.; COLE, J.A.; SMITH, H. Sialylation of lipopolysaccharide and loss of absorption of bactericidal antibody during conversion of gonococci to serum resistance by cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid. **Microb. Pathog.**, v. 7, n. 1, p. 63-72, 1989.

PATON, J. C..; PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 450-479, 1998.

PATON, A.; BOURNE, A.J.; MANNING, P.A.; PATON, J.C. Comparative Toxicity and Virulence of *Escherichia coli* Clones Expressing Variant and Chimeric Shiga-Like Toxin Type II Operons. **Infect. Immun.**, v. 63, n. 7, p. 2450-2458, 1995.

PATON, A.; PATON, J. C.; GOLDWATER, P.N.; HEUZENROEDERB, M.W.; MANNING, P.A. Sequence of a variant Shiga-like toxin type-1 operon of *Escherichia coli* O111:H-. **Gene**, v. 129, p. 87-92, 1993.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: current and future trends. Immunol. **Cell Biol.**, v. 82, n. 5, p. 488-496, 2004.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M.M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M. *et al*. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. **Science**, v. 286, p. 1816-1820, 2000.

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

PON, R.A.; LUSSIER, M.; YANG, Q.L.; JENNINGS, H.J. N-Propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique bactericidal capsular epitope in group B *Neisseria meningitidis*. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 11, p. 1929-1938, 1997.

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

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

RAMSAY, M.; KACZMARSKI, E.; RUSH, M.; MALLARD, R.; FARRINGTON, P.; WHITE, J. Changing patterns of case ascertainment and trends in meningococcal disease in England and Wales. **Commun. Dis. Rep. CDR Rev.**, v. 7, n. 4, p. R49-54, 1997.

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

READ, R.C.; ZIMMERLI, S.; BROADDUS, C.; SANAN, D.A.; STEPHENS, D.S.; ERNSDT, J.D.; The (alpha2-->8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 8, p. 3210-3217, 1996.

REQUEJO, H.I.Z. **A meningite meningocócica no mundo:** Dois séculos de história das epidemias. São Paulo: Edições Inteligentes, 2004. p. 9-34.

REQUEJO, H.I.Z. Comportamento imunológico das vacinas anti-meningocócicas. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 402-416, 1997.

RESENDE, F.C. B., PASSOLD, J., FERREIRA, S.I.A.C., ZANETTI, C.R.,. LIMA, H.C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos

ou animais. **Rev. Bras. Alergia e Imunopatologia**, v. 27, n. 3, p. 116-124, 2004.

RICHMOND, P.; BORROW, R.; GOLDBLATT, D.; FINDLOW, J.; MARTIN, S.; MORRIS, R.,*et al*. Ability of three different meningococcal C conjugate vaccines to induce immunologic memory after a single dose UK toddlers. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 1, p. 160-163, 2001.

ROSENSTEIN, N.E.; PERKINS, B.A.; STEPHENS, D.S.; LEFKOWITZ, L.; CARTTER, M.L.; DANILA, R. *et al*. The changing epidemiology of meningoccal disease in the United States. **J. Infect. Dis.**, v. 160, n. 6, p. 1894-1901, 1999.

RYTKONEN, A.; ALBIGER, B.; HANSSON-PALO, P.; KALLSTROM, H.; OLCEN, P.; FREDLUND, H.; JONSSON, A. B. *Neisseria meningitidis* undergoes PilC phase variation and PilE sequence variation during invasive disease. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 402-409, 2004.

SACCHI, C.T.; LEMOS, A.P.S.; CAMARGO, M.C.C.; WHITNEY, A.M.,; MELLES, C.E.A.; SOLARI, C.A; FRASCH, C.; MAYER, L.W. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 4 in São Paulo - Brazil, 1990 to 1996. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 40, n. 2, p. 65-70, 1998.

SALIT, I.E.; MORTON, G. Adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 31, n. 1, p. 430-435, 1981.

SARDIÑAS, G.; REDDIN, K.; PAJON, R.; GORRINGE, A. Outer membrane vesicles of *Neisseria lactamica* as a potential mucosal adjuvant. **Vaccine**, v. 12, p. 206-214, 2006.

SAUKKONEN, K.; LEINONEN, M.; KÄYHTY, H.; ABDILLAHI, H.; POOLMAN, J.T. Monoclonal antibodies to the rough lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* protect infant rats from meningococcal infection. **J. Infect. Dis.**, v. 158, n. 1, p. 209-212, 1988.

SCHRYVERS, A.B.; GONZALEZ, G.C. Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. **Can. J. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 145-147, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, v. 1, p. 82-89, 1993.

SIMÕES, M. A.; FERREIRA, L. C. S. Adjuvantes de Mucosas. Aliados na busca de vacinas orais mais eficazes. **Biotecnolog. Ciênc. Desenvolv.,** Brasilia, v. 19, p. 32-35, 2001.

SOUTHAM, D.S.; DOLOVICH, M.; O'BYRNE, P.M.; INMAN, M.D. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 282, p. 833-839, 2002.

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

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 4, p. 622-647, 1992.

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

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

THORPE, C.M.; HURLEY, B.P.;ACHESON, D.W. Shiga toxin interactions with the intestinal epithelium. **Methods Mol. Med.**, v. 73, p. 263-273, 2003. Review.

TSUJI, T.; SHIMIZU, T.; SASAKI, K.; SHIMIZU, Y.; TSUKAMOTO, K.; ARIMITSU, H.; OCHI, S.; SUGIYAMA, S.; TANIGUCHI, K.; NERI, P.; MORI, H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. **Vaccine**, v. 26, n. 4, p. 469-476, 2008.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-149, 1992.

TZENG, Y.L.; STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitides.* **Microbes Infect.**, v. 2, n. 6, p. 687-700, 2000.

VIDARSSON, G.; VAN DER POL, W.L.; VAN DEN ELSEN, J.M.; VILÉ, H.; JANSEN, M.; DUIJS, J. *et al*. Activity of human IgG and IgA subclasses in immune defense against Neisseria meningitidis serogroup B. **J. Immunol.**, v. 15, n. 10, p. 6250-6256, 2001.

VIRJI, M.; WATT, S.M.; BARKER, S.; MAKEPEACE, K.; DOYONNAS, R. The N-domain of the human CD66a adhesion molecule is a target for Opa proteins of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Mol. Microbiol.**, v. 22, p. 929-939, 1996.

VOGEL, U.; CLAUS, H.; HEINZE, G.; FROSH, M. Role of lipopolysaccharide sialylation in serum resistance of serogroup B and C meningococcal disease isolates. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 954-957, 1999.

VOGEL, U.; FROSH, M. Mechanisms of neisserial serum resistance. **Mol. Microbiol.**, v. 32, n. 6, p. 1133-1139, 1999. Review.

VOGEL, U.; HAMMERSCHIMIDT, S.; FROSH, M. Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 185, n. 2, p. 81-87, 1996.

WEN, S.X.; TEEL, L.D.; JUDGE, N.A.; O'BRIEN, A.B. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. **Vaccine**, v. 24, p. 1142-1148, 2006.

Xiang Gai; Kun Cai; Jing Shi; Hao Liu; Xiaojun Hou; Wei Tu; Le Xiao; QinWang; HuiWang. Immunogenicity of a novel Stx2B–Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Vaccine**, v. 17, p. 2070-2076, 2009.

ZHANG, W.L.; BIELASZEWSKA, M.; KUCZIUS, T. ;KARCH, H. Identification, Characterization and Distribution of Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 4, p. 1441-1446, 2002.

ZOLLINGER, W.D.; MORAN, E.E.; DEVI, S.J.; FRASCH, C.E. Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 3, p. 1053-1060, 1997.

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

ZOLLINGER, W.D.; KASPER, D.L.; VELTRI, B.J.; ARTENSTEIN, M.S. Isolation and characterization of a native cell wall complex from *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v. 6, n. 5, p. 835-851,1972.