

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**USO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS NA SELEÇÃO
DE ANTÍGENOS LIPOPOLISSACÁRIDES (LPS) DA CEPA
EPIDÊMICA B:4:P1.15 DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* B:
IMUNIZAÇÃO NASAL.**

Lígia Maria de Castro Carvalho Coutinho

**Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE**

**Orientadora
Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari**

**SÃO PAULO
2002**

LÍGIA MARIA DE CASTRO CARVALHO COUTINHO

**USO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS NA SELEÇÃO
DE ANTÍGENOS LIPOPOLISSACÁRIDES (LPS) DA CEPA
EPIDÊMICA B:4:P1.15 DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* B:
IMUNIZAÇÃO NASAL.**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre

Profª. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari
Orientador/Presidente

Profª. Dra. Ises Abrahamsohn
1º examinador

Prof. Dra. Kioko Takei
2º examinador

São Paulo, 6 de junho de 2002.

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005156

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C871u Coutinho, Lígia Maria de Castro Carvalho
Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacarídicos (LPS) da cepa epidêmica B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis* B : imunização nasal / Lígia Maria de Castro Carvalho Coutinho. -- São Paulo, 2002.
135p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: De Gaspari, Elizabeth Natal

1. Imunologia 2. Meningite : Medicina 3. Anticorpos monoclonais : Imunologia 4. Vacina : Farmacologia I. T. II. De Gaspari, Elizabeth Natal, orientador.

615.37 CDD

**USO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS NA SELEÇÃO
DE ANTÍGENOS LIPOPOLISSACARÍDICOS (LPS) DA
CEPA EPIDÊMICA B:4:P1.15 DE *NEISSERIA*
MENINGITIDIS B: IMUNIZAÇÃO NASAL.**

Este trabalho foi realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, sendo o projeto aprovado pelo Comitê Técnico e Científico desta Instituição.

Apoio Financeiro: FAPESP, processos 99/00638-6 e 99/00557-6

*Dedico este trabalho
Aos meus pais
Homero e Maria Lígia,
meus maiores exemplos.*

Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida e por me acompanhar em todos os caminhos que tenho trilhado,

À Dra. Elizabeth Natal De Gaspari, minha orientadora, pelo auxílio e por tudo que aprendi com a realização desse trabalho,

Aos meus irmãos; Cristina, Flávio e Renato, meus companheiros de todas as horas,

À minha avó Maria Iguaracy, tios e primos pelo carinho,

Aos meus amigos Aline, Ana Patrícia, Dimitri, Elza e Matheus pela imensa ajuda nesse trabalho, apoio e amizade,

À Cecília O. Gorla, pesquisadora da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na execução do ensaio de atividade bactericida,

À Dra. Adriana Pardini Vicentini, pesquisadora da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pela cuidadosa leitura deste trabalho,

Aos pesquisadores, estagiários e auxiliares da Seção de Imunologia, Sorologia e Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz por terem me recebido com grande apreço,

Às Dras. Glória Maria Collet Lima e Kioko Takei e ao Dr. Sandro Rogério de Almeida pelas sugestões que melhoraram o entedimento do trabalho,

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho,

E a todos que indiretamente participaram da realização deste trabalho, meu eterno carinho.

SUMÁRIO

Pág

- LISTA DE ABREVIATURAS

- RESUMO

- ABSTRACT

I- INTRODUÇÃO 1

1a - A doença meningocócica 1

1b - Epidemiologia 3

1c - Patogenia e fatores de virulência 6

1d - Classificação 8

1e - Vacinas 10

1f - LPS 21

1g - A imunidade de mucosa 25

OBJETIVOS 33

II- MATERIAIS E MÉTODOS 35

2a - Animais 35

2b - Cepas de bactérias 35

2c - Crescimento bacteriano 35

2d - Purificação dos LPS dos imunitipos L3,7,9 e L8 de membrana externa da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 36

2e - "Colony-Blot" 36

2f - Citometria de fluxo 37

2g - Extração das proteínas de membrana externa (Outer Membrane Complex, OMCs) 38

2h - Preparo da suspensão de células bacterianas íntegras ("whole-cells") de *N. meningitidis* 39

2i - Obtenção de anticorpos policlonais anti- *N. meningitidis* 40

2j - Obtenção de saliva 41

2l - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 42

2m - "Immunoblotting" 44

2n - ELISA 46

2o - Atividade Bactericida 47

III- RESULTADOS	48
3a - Caracterização imunoquímica das preparações antigênicas utilizadas	48
3b - Citometria de Fluxo	53
3c - ELISA	55
- 3c.1. Reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 30º e no 60º dia após imunização pela via intramuscular com OMC de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 homólogas selecionadas para epítomos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	55
- 3c.2. Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 35º dia após imunização pela via intranasal com OMC de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 homólogas selecionadas para epítomos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	60
- 3c.3. Reatividade cruzada com cepas heterólogas de <i>N. meningitidis</i> de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9 ↑ e B:4:P1.15 L8↑.	64
- 3c.4. Reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nas salivas de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC de cepas de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 homólogas selecionadas para epítomos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	71
- 3c.5. Reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos após 4 meses e 1 ano da imunização pela via intranasal com OMC de cepas homólogas de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 selecionadas para epítomos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	75
3d - "Immunoblotting"	80
- 3d.1. Reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 30º e 60º dia após imunização pela via intramuscular com OMC de cepas homólogas de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 selecionadas para epítomos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	80
- 3d.2. Reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 35º dia após imunização pela via intranasal com OMC de cepas homólogas de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 selecionadas para epítomos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	87
- 3d.3. Reatividade cruzada com cepas heterólogas de <i>N. meningitidis</i>	95

SUMÁRIO

de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9 ↑ e B:4:P1.15 L8↑.

- 3d.4. Reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nas salivas de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal e intramuscular com OMC de cepas homólogas de <i>N. meningitidis</i> B:4:P1.15 selecionadas para epítopos de LPS (L3,7,9 ↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓).	99
3e - Atividade Bactericida	102
IV- DISCUSSÃO	105
V- CONCLUSÃO	115
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC: 3- amino-9-ethylcarbazole
BALT: Tecido linfóide associado aos brônquios
Blot: "Immunoblotting"
B:4:P1.15 L3,7,9 ↑: cepa de *N. meningitidis* com maior expressão de LPS do imunotipo L3,7,9
B:4:P1.15 L3,7,9 ↓: cepa de *N. meningitidis* com menor expressão de LPS do imunotipo L3,7,9
B:4:P1.15 L8 ↑: cepa de *N. meningitidis* com maior expressão de LPS do imunotipo L8
B:4:P1.15 L8 ↓: cepa de *N. meningitidis* com menor expressão de LPS do imunotipo L8
C: complemento
Cepa 44/89: cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 utilizada no ensaio bactericida
cm: centímetro
CO₂: gás carbônico
CPS: polissacáride capsular
CtrA: capsule polysaccharide export outer membrane protein
DAB: 3,3 diaminobenzidina
dil: diluição
D.O.: Densidade Óptica
E.coli: *Escherichia coli*
ELISA: "ENZYME - LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY"
EDTA: acidoetilenodiaminotetracético
ETs: Electroforetic types
FACS: "Fluorescence Activated Cell Sorting"
Fbp: "Ferric binding protein"
FITC: fluorescein isothiocyanate
Frp: "Ferric regulated protein"
FUNASA: Fundação Nacional da Saúde
g: constante de gravitação; quando referente à força gravitacional atuante na centrífuga
g: gramas; quando referente ao peso de reagentes e soluções
GALT: Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
GNA: "genome - derived *Neisseria antigens*"
H₂O₂: água oxigenada
H₂SO₄: ácido sulfúrico
IgA: Imunoglobulina do isótipo A
IgG: Imunoglobulina do isótipo G
IgM: Imunoglobulina do isótipo M
IM: Imunização pela via intramuscular
IN: Imunização pela via intranasal

ABREVIATURAS

kDa: Kilodalton
kDO: 2-ceto 3- desoxí - octanato
Lip: "*Lipoprotein*"
LOS Lipooligossacáride
Lpb: "*Lactoferrin binding protein*"
LPS: Lipopolissacáride
μl: Microlitro
μg: Micrograma
M: Molar
mA: Miliâmpere
MALT: Tecido linfóide associado à mucosa
mg: miligramas
mL: mililitro
mM: Milimolar
N: Normal
NALT: tecido linfóide associado ao trato nasal
N. meningitidis: *Neisseria meningitidis*
NaCl: cloreto de sódio
Ng: nanograma
NspA: "*Neisserial superficie protein A*"
NT: não sorotipável
"*overnight*": período de aproximadamente 18 horas
OMC: "*Outer membrane complex*"
OMP: "*Outer membrane proteins*"
OMV: "*Outer membrane vesicles*"
OpA: "*Opacity Associated protein*"
OpC: "*Outer membrane protein class 5 percussor*"
PAGE: "*Polyacrylamide gel electrophoresis*"
PBS: Solução tampaponada salina fosfato
P.M.: Peso molecular
PMSF: Phenilmethylsulphonyl fluoride
Por: Porina
R.F.: "*Relative front*"
w.c.: "*whole-cells*" (suspensão de células bacterianas íntegras)
WB: "*Western Blotting*"
S: salina
SAB: Soro Albumina Bovina
SigA: IgA secretora
SDS- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
Tbp: "*Transferrin binding protein*"
TMB: Tetrametilbenzidina
Tris: (hidroximetil) aminometano
TSB: Tryptose Soy Broth

ABREVIATURAS

ufc: unidade formadora de colônia

V: Volts

RESUMO

A alta característica epidêmica e a mortalidade fazem da doença meningocócica um sério problema de saúde pública. Isto fez com que vários centros de pesquisas direcionassem sua atenção para o desenvolvimento de uma vacina contra o meningococo B. As vacinas existentes no momento são contra os sorogrupos A, C, Y e W135.

Para conseguir uma vacina segura muitos antígenos da membrana externa bacteriana tornaram-se alvo de estudos. Um dos componentes que tem sido estudado para ser utilizado em uma preparação vacinal contra *Neisseria meningitidis* B é o lipopolissacáride (LPS).

Lipopolissacárides são macromoléculas lipoprotêicas que fazem parte da membrana externa das bactérias gram-negativas. O interessante é que muitos estudos com estas moléculas mostraram características adjuvantes na resposta imune contra a *N. meningitidis* B. Entretanto um problema com estas moléculas é o efeito tóxico que elas causam devido ao lipídio A contido em sua estrutura.

O presente estudo teve como finalidade a avaliação da especificidade e capacidade protetora dos anticorpos induzidos em modelo animal com "outer membrane components" OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas por meio de "colony-blot" utilizando anticorpos monoclonais anti-L3,7,9 e L8 para maior e menor expressão dos LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8.

A princípio realizamos a seleção das cepas por "colony-blot" para depois procedermos à extração dos componentes de membrana externa bacteriana (OMC) obtidos das cepas selecionadas (B:4:P1.15 L3,7,9[↑], B:4:P1.15 L3,7,9[↓], B:4:P1.15 L8[↑] e B:4:P1.15 L8[↓]) e à imunização pela via intranasal (IN) e intramuscular (IM) dos camundongos BALB/c.

Nesse estudo foram analisadas: a reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros e nas salivas dos camundongos imunizados pelas vias IN e IM e a presença no soro de anticorpos com atividade bactericida. Nos soros de camundongos imunizados pela via IN foram analisadas também a reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes 4 meses e 1 ano após a imunização e a reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA de reatividade cruzada contra suspensão de células bacterianas íntegras das cepas de *N. meningitidis* heterólogas (B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT, e C:2a:P1.2).

Na análise da presença de anticorpos no soro (obtidos em diferentes dias após a imunização) e na saliva, foi observada a resposta tanto contra suspensão de células bacterianas íntegras como para OMC das cepas selecionadas.

Os resultados da dosagem de anticorpos por ELISA mostram que os camundongos imunizados pela via IM produziram altos títulos de anticorpos dos isótipos IgG e os camundongos imunizados pela via IN produziram anticorpos dos isótipos IgG e IgA específicos contra células bacterianas íntegras das

RESUMO

cepas homólogas e heterólogas de *N. meningitidis*. A análise da especificidade por "Immunoblotting" dos anticorpos presentes nos soros dos camundongos imunizados pela via IN e IM mostrou que a resposta foi direcionada para proteínas da classe 1, 2, e 5 e também para proteínas de 50, 65 e 70 kDa da suspensão de células bacterianas íntegras e OMC da cepas B:4:P1.15 L3,7,9[↑], B:4:P1.15 L3,7,9[↓], B:4:P1.15 L8[↑] e B:4:P1.15 L8[↓]. A especificidade dos anticorpos dos isótipos IgG e IgA (obtidos soros de camundongos imunizados pela via IN) contra cepas B:4:P1.9, B:14:NT, B:4:NT e C:2a:P1.2 mostrou que a resposta foi direcionada principalmente contra proteínas acima de 50 kDa.

Na saliva de camundongos imunizados pela via IN, anticorpos do isótipo IgA foram observados por meio de ELISA e "Immunoblotting", sendo que por meio de "Immunoblotting", verificamos que esta resposta foi direcionada para proteínas de 28 kDa, 33 kDa e acima de 50 kDa.

Os resultados apresentados dos ensaios bactericidas mostraram que os grupos de camundongos que receberam imunização pela via IN produziram altos títulos de anticorpos com atividade bactericida contra as cepas homólogas.

Quando comparamos as preparações antigênicas obtidas de cepas com maior ou menor expressão dos imunotipos L3,7,9 e L8 não pudemos observar diferenças significativas por meio de ELISA. Entretanto por meio de "Immunoblotting" observamos diferenças na especificidade da resposta, especialmente para peptídeos de alto peso molecular.

As análises da especificidade dos anticorpos indicam que a seleção de cepas com maior expressão de LPS pode ser importante para iniciar uma resposta efetiva tanto sistêmica como de mucosa quando apresentados em uma preparação vacinal através da via nasal e vem ressaltar a importância do estabelecimento do imunotipo na produção de vacina meningocócica capaz de induzir uma imunidade duradoura em todas as idades tanto pela via mucosa como sistêmica.

Palavras chaves: *Neisseria meningitidis*, lipopolissacáride (LPS), vacina nasal, complexo de membrana externa (OMC).

ABSTRACT

Meningococcal disease poses a serious public health problem, due to their characteristics of being highly epidemic, with a high mortality rate. This fact led many research centers to turn their efforts to the development of a vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B. The vaccines available at the present time are directed to serogroups A, C, Y and W135.

In order to obtain a safe vaccine, many of the antigens of the outer membrane of the bacteria are being studied. Among the components being studied for eventual use in a vaccine against *N. meningitidis* B are the lipopolysaccharides (LPS).

Lipopolysaccharides are complex macromolecules lipoprotein which integrate the outer membrane of gram-negative bacteria. It is interesting that many of the studies involving these molecules have shown adjuvant characteristics in the immune response against *N. meningitidis* B. However, there is a problem with these molecules, due to the toxic effects of the lipid A present in their structure. The present study had the aim of evaluating the specificity and protective activity of the antibodies induced in an animal model by the outer membrane complex (OMC) obtained from strains of *N. meningitidis* B:4:P1.15. The strains used for immunization of mice were selected through colony-blot, using anti L3,7,9 and L8 monoclonal antibodies, for the highest and the lowest expression of the LPS of immunotypes L3,7,9 and L8. First we selected the strains using colony blots, then we performed the extraction of the OMC of the bacteria belonging to the selected strains (B:4:P1.15 L3, 7, 9 $\uparrow$, B:4:P1.15 L3, 7, 9 $\downarrow$, B:4:P1.15 L8 $\uparrow$ and B:4:P1.15 L8 $\downarrow$) followed by, the intranasal (IN) and intramuscular (IM) immunization of the BALB/c mice with the purified OMC.

The present study analyzed the reactivity of the antibodies (IgM, IgG and IgA) found in the serum and in the saliva of mice who were immunized IN or IM, as well as the presence in the serum of antibodies with bactericidal activity. In the serum of the IN immunized mice, antibodies found four months and one year after immunization and with cross-reactivity against a whole-cell suspension of heterologous strains of *N. meningitidis* bacteria (B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT and C:2a:P1.2) were also tested.

The analysis of the presence of antibodies in the serum (obtained 30 after immunization) and in the saliva showed reactivity against both the whole-cell bacteria and the OMC of the strains selected. In study of antibodies found four months and one year after the immunization against the strains B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT and C2a:P1.2 only the reactivity against the whole-cell suspension of the bacteria were analyzed.

The results of the ELISA test shows that IM immunized mice produced higher levels of antibodies of the IgG isotype and the IN immunized ones produced higher levels of antibodies of the IgG and IgA isotypes, specific against whole-cells of homologous and heterologous strains of *N. meningitidis*. The analysis of specificity through the Immunoblotting of the antibodies found in the serum of the IM and IN immunized mice revealed that the response was directed mainly against the proteins of classes 1, 2 and 5, and also against proteins 50, 65 and 70 kDa of the whole-cell suspension bacteria and the OMC of strains B:4:P1:15 L3, 7, 9 $\uparrow$, B:4:P1:15 L3, 7, 9 $\downarrow$, B:4:P1.15 L8 $\uparrow$ and B:4:P1:15 L8 $\downarrow$. The specificity of antibodies of isotypes IgG and IgA (obtained from the serum of intranasally immunized mice) against strains B:4:P1.9, B:14NT, B:4:NT and C.2a.P1.2 revealed that the response was directed mainly against proteins of molecular weight higher than 50 kDa.

In the saliva of IN immunized mice the reaction of antibodies of the IgA isotype was also observed by ELISA and Immunoblotting. The response was directed against proteins of 28 kDa, 33 kDa and higher than 50 kDa. When the antigen preparations obtained from the strains with the highest and lowest expressions of immunotypes L3,7,9 and L8 were compared, no significant differences were found by ELISA. Immunoblotting analysis, however, showed differences in the specificity of the response, particularly for peptides of high molecular mass.

The titers obtained by the assay of bactericidal assay were higher for the mice IN immunized with strains selected for LPS L3, 7, 9 and L8.

The results of antibodies specificity indicate that the selection of LPS may be important to elicit systemic as well as local mucosal effective immune response, when used in an intranasal vaccine preparation. This work indicates the importance of selecting LPS immunotypes in order to obtain a meningococcal vaccine capable of inducing a lasting immunity in people of all ages, in both the mucosal and the systemic modes of admission.

KEYWORDS: *Neisseria meningitidis*, lipopolysaccharide (LPS), nasal vaccine, outer membrane complex (OMC).

I- Introdução

1a - A doença meningocócica

Até o momento, um dos principais desafios na doença meningocócica tem sido a busca de uma prevenção eficaz através da imunoprofilaxia contra a *Neisseria meningitidis* B.

Este microrganismo foi reconhecido pela primeira vez por Vieusseux em 1805, sendo denominada primeiramente de *Diplococcus intracellularis meningitidis* e depois de *Neisseria meningitidis*. O primeiro isolamento de *N. meningitidis*, também conhecida como meningococo, foi realizado por Anton Weichselbaum por volta de 1887, motivo pelo qual, por muito tempo, a doença meningocócica ficou conhecida como "Doença de Weichselbaum" (DE VOE, 1982).

Sabe-se que vários agentes etiológicos podem ser considerados como causa da meningite cerebroespinal. Contudo um dos principais agentes é a *N. meningitidis*. Coulciman em 1898 encontrou o meningococo em 31 dos 34 casos de meningite, relacionando assim este microrganismo como o principal agente responsável pela meningite cerebroespinal (DE VOE, 1982).

Consideradas ou classificadas como bactérias gram-negativas *N. meningitidis* apresentam-se dispostas aos pares, ou seja, na forma de diplococos, capazes de multiplicar-se fora das células do hospedeiro. Suas colônias apresentam as seguintes características: são convexas, transparentes, não pigmentadas, não hemolíticas e têm com aproximadamente 0,6 a 1 µm de diâmetro. A identificação bacteriológica se faz através da semeadura em ágar contendo vários açúcares entre os quais pode-se citar: dextrose, maltose, levulose e lactose. A utilização de maltose e dextrose é uma propriedade característica do meningococo, sendo por isso utilizado para diferenciação

INTRODUÇÃO

desse e de outros microrganismos gram-negativos que não utilizam esses açúcares. A *Neisseria* apresenta bom crescimento em meios de cultura como: ágar Müeller-Hinton, Thayer-Martin e Müeller-Hinton -chocolate em atmosfera de CO₂ e à temperatura de 37°C (HOLT et al., 1994).

Esse microrganismo é um habitante comum da mucosa do trato respiratório superior humano e sua transmissão é feita através do contato de pessoas saudáveis com secreções nasofaríngeas, principalmente dos portadores assintomáticos. Aliás, uma das questões que mais intriga na doença meningocócica é a presença de portadores assintomáticos. A presença de portadores assintomáticos é atribuída ao limitado potencial patogênico das cepas dos portadores e pela imunidade induzida por proteínas semelhantes a outras cepas não patogênicas ou de outras bactérias gram-negativas, como a *E.coli* K1, que tem estrutura muito semelhante à do meningococo (RAFF et al., 1988; DEVI et al., 1991). A taxa de portadores e a conseqüente transmissão é maior em adultos que vivem em locais de aglomerações e em instituições fechadas.

A transmissão indireta é questionada pois o meningococo é susceptível à temperatura e à dissecação. O período de incubação varia de 2 a 10 dias e a transmissibilidade persiste até que o meningococo desapareça das secreções da nasofaringe. A freqüência de portadores na população normal varia de 5 a 10% durante períodos não epidêmicos, mas pode chegar a 100% durante as epidemias (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A infecção meningocócica pode ser limitada à nasofaringe, apresentando somente sintomas locais ou assintomática, ou pode se manifestar como forma septicêmica grave podendo atingir concomitantemente vários órgãos como pele, olhos e até coração. A doença é caracterizada por início súbito, apresentando sintomas como calafrios, febre alta (39°C ou mais), náuseas, vômitos, dores pelo corpo, prostração e mal-estar, e, quando evolui para uma meningococcemia, podem aparecer exantema petequial ou púrpuras hemorrágicas. O último estágio da doença é caracterizado pela síndrome de

Waterhouse-Friderichen e falência múltipla dos órgãos (MEYER et al., 1994; ROSENSTEIN et al., 2001).

Em 90% dos casos, a doença meningocócica progride para a inflamação das leptomeninges (pia-mater e aracnóide) com lesões cutâneas associadas. As complicações geralmente podem deixar seqüelas, sendo as mais freqüentes as de ordem neurológica, como paralisias e paresias, mas também são freqüentes necroses de áreas externas, surdez, miocardite e pericardite (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O diagnóstico etiológico da doença meningocócica pode ser feito através de cultura de sangue, secreções de lesões cutâneas e pesquisa de antígenos no líquido através da contraímuno-elektroforese e aglutinação em látex (MELLES et al., 1978).

A letalidade é ainda elevada, especialmente quando ocorre a meningococcemia, ficando a taxa em torno de 10 a 20% e igual taxa de pacientes apresenta seqüelas permanentes (FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

1b - Epidemiologia

Na atualidade, a meningite meningocócica tem despertado atenção pela mudança no seu padrão epidemiológico e aumento da prevalência em várias partes do mundo onde não havia índices significativos de incidência (PELTOLA.,1998; TZENG & STEPHENS, 2000). A doença meningocócica continua sendo um problema na África, e, ao mesmo tempo, mortes causadas pela doença têm aumentado nos últimos dez anos na América do Sul, no sudeste africano, na Europa e na Ásia. No continente africano, na região do sub-Sahara situa-se o cinturão da meningite, que abrange desde o Senegal, na costa oeste, até a Etiópia, na costa leste, onde a taxa de incidência da doença chega a 1% da população. Os sorogrupos A, B e C são responsáveis por 90% da doença meningocócica. A maioria das epidemias são causadas pelos

INTRODUÇÃO

sorogrupos A e C, mas a prevalência do grupo B está aumentando, como foi evidenciado em diferentes epidemias ocorridas em várias partes do mundo. Desde 1980, a meningite meningocócica causada pelas cepas A e C ocorre principalmente na Europa, nos Estados Unidos, Canadá, China, Nepal, Mongólia, Nova Zelândia, Cuba, Brasil, Chile, Arábia Saudita e sul da África. No Brasil, após epidemia causada por meningococos em 1971-75, o sorogrupo B passou a predominar especialmente em São Paulo (SACCHI et al., 1998).

A primeira metade da década de 70 foi marcada por uma grande epidemia causada pelos meningococos dos sorogrupos A e C, apresentando taxas de incidência que atingiram até 170/100.000 habitantes em determinadas cidades do país e a partir de 1976, a ocorrência voltou a valores endêmicos. A década de 80 iniciou-se com baixa incidência da doença, além do predomínio do meningococo do sorogrupo B. A partir de 1986, nota-se um aumento significativo na incidência deste sorogrupo. A década de 90 foi caracterizada pela diminuição do sorogrupo B e aumento da doença causada pelo meningococo C. Os demais sorogrupos estão geralmente mais presentes em portadores nasofaríngeos e não muito correlacionados à doença devido ao baixo poder destes sorogrupos em transpor a mucosa nasofaríngea (PELTOLA, 1998). Segundo dados do Departamento de Controle e Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, em 1999, dos 516 casos de meningite meningocócica notificados no Estado, 66,28% foram causados pelo sorogrupo B, 30,23% causados pelos sorogrupo C e 3,48% causados por outros sorogrupos. Recentemente ALKMIN et al, 2001 investigando a prevalência de meningococos em soro de pacientes da região de Campinas pela técnica de contraímunoeletroforese demonstraram um aumento na incidência de *N. meningitidis* do sorogrupo C em relação ao sorogrupo B.

O aumento da incidência da doença meningocócica na população está relacionada à deficiência dos componentes do complemento, de células com funções opsonofagocítica e ainda a fatores ambientais (ROSENSTEIN et al, 2001). Pode-se citar ainda a mudança de carga e hidrofobicidade da mucosa

INTRODUÇÃO

nasal causadas principalmente por fumo ou infecções preestabelecidas; fazendo com que pessoas fumantes ativas ou passivas e aqueles que apresentam infecções recentes da mucosa fiquem com maior susceptibilidade a infecções pelo meningococo (STEPHENS et al., 1999). Estudos epidemiológicos em relação à doença demonstram a existência de casos esporádicos durante todo o ano, sendo estes mais freqüentes nos meses de outono/inverno devido principalmente às condições ambientais. Em intervalos regulares, a doença aparece em períodos epidêmicos que podem durar de 2 a 5 anos. A distribuição geográfica da doença é universal, ocorrendo casos esporádicos tanto em zonas urbanas como rurais. A aglomeração intradomiciliar favorece a transmissão, tanto que a freqüência da doença é alta em alojamentos militares, creches e internatos. É primordialmente uma doença de crianças e adultos jovens. Um terço dos casos ocorrem em idades de 0 a 4 anos, um terço ocorre de 5 a 19 anos e outro terço acima dos 20 anos. Em situações epidêmicas, a doença geralmente atinge todos os grupos de maior idade mas a maioria das crianças, por não ter anticorpos séricos contra o meningococo, fica mais susceptível. Estudos epidemiológicos mostram que o meningococo raramente causa infecção assintomática em crianças menores de 4 anos (freqüência inferior a 1%). Esta prevalência aumenta com a idade atingindo cerca de 5% dos indivíduos de 14 a 18 anos (PELTOLA, 1998).

Quanto ao sorotipo e subtipo há uma grande variabilidade de uma região para outra (PELTOLA, 1998).

Poucos estudos foram feitos sobre a distribuição dos imunotipos (LPS) entre os sorogrupos de meningococos. Estudos de SCHOLTEN et al., 1994, empregando a técnica de Dot - ELISA e anticorpos monoclonais, mostraram, por meio de imunotipagem de 563 cepas isoladas na Holanda no período de 1989-90, a prevalência dos imunotipos L3, L3,8 e L10 ao sorogrupo A; L1,8, L2, L3, L3,8, L4 e L8 ao sorogrupo B e para o sorogrupo C a prevalência dos imunotipos L2, L3, L3,8, L4 e L8. Para os demais sorogrupos de *N. meningitidis* foram identificados os imunotipos L2, L3, L3,1 e L4.

Com o uso de dois novos anticorpos monoclonais para epítomos de LPS (L8, L1) e o AcM para o imunotipo L3,7,9, BELO & DE GASPARI, 2001 avaliaram a prevalência de imunotipos de LPS em cepas isoladas durante epidemias de *N. meningitidis* dos sorogrupos A,B e C ocorridas no Brasil. Esse estudo permitiu demonstrar a grande prevalência de 98% do imunotipo L3,7,9 seguida de L8 (15%) ao sorogrupo B de *N. meningitidis* isoladas durante o ano de 1992.

1c - Patogenia e fatores de virulência

O meningococo penetra no organismo humano através do trato respiratório superior. Primeiramente o meningococo invade a barreira mucosa, liga-se às células epiteliais não ciliadas, de onde são transportados em vacúolos fagocíticos até as camadas subepiteliais, alcançado depois a circulação sistêmica chegando até as meninges, as membranas que revestem o cérebro (DE VOE, 1982; STEPHENS et al., 1986; JERSE & REST, 1997; ROSENSTEIN et al., 2001).

O pili ou fimbrias é o principal componente bacteriano responsável pela adesão do meningococo à células epiteliais não ciliadas, mas outras proteínas de superfície (por exemplo a Opa (*opacity associated protein*) e Opc (*outer membrane protein class 5 precursor*) participam em conjunto deste processo (STEPHENS et al., 1999). As fimbrias são as principais estruturas envolvidas no processo de adesão às células epiteliais do hospedeiro e as proteínas Opa e Opc são responsáveis pela invasão da bactéria nas matrizes extracelulares, células endoteliais, neutrófilos e monócitos (STEPHENS et al., 1999). Embora a função ciliar das células da mucosa nasofaríngea pareça não ser influenciada pelo LPS não se descarta a participação deste na adesão do meningococo (DE VOE, 1982).

Quando o meningococo atinge as meninges há liberação de componentes de sua estrutura externa e estes estimulam várias células do sistema de defesa; dentre elas macrófagos e microglia a produzirem citocinas (principalmente TNF- α , IL-1 e IL-6) que induzem resposta inflamatória responsável pelos sintomas da meningite. Estas citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1, liberadas podem aumentar também a permeabilidade da barreira hemato-encefálica o que facilita a entrada do meningococo no líquido cefalo-raquidiano (DE VOE, 1982).

Durante o evento de adesão, o meningococo causa, entre outros efeitos, perda da atividade ciliar e da microvilosidade das células epiteliais. Além disso, os meningococos liberam toxinas solúveis ou induzem no hospedeiro fatores citotóxicos. Sabe-se que o LOS (lipooligossacáride), componente do LPS, é o principal fator envolvido no choque séptico, pois tem papel importante na indução de citocinas e na ativação de complemento (JONES et al., 1992; MACKINNON et al., 1993; VERHEUL, et al., 1993).

Os meningococos possuem vários mecanismos de escape do sistema imune. Alguns dos componentes da membrana e da cápsula que estão envolvidos na adesão da bactéria na superfície dos tecidos participam também de mecanismos antifagocitários e de inibição ou inativação de complemento. Componentes como os polissacárides e lipopolissacárides apresentam mimetismo imunológico com estruturas idênticas à do hospedeiro, impedindo com isso a indução de anticorpos efetivos contra a bactéria. O ácido siálico capsular é importante na resistência do organismo à lise mediada pelo complemento. A cápsula dos meningococos B, por exemplo, não é capaz de ativar a via alternativa de complemento (VIDARSON et al., 2001).

Proteínas envolvidas na aquisição de ferro, como lactoferrina e transferrina, também colaboram para o aumento do potencial patogênico do meningococo (VIRJI et al., 1995; ROSENSTEIN et al., 2001).

Um outro mecanismo de escape muito discutido é o bloqueio da atividade bactericida dos anticorpos pela ação da IgA sérica. A IgA, estimulada pela presença do meningococo, se liga a superfície dos meningococos, impedindo a

fixação das imunoglobulinas dos isótipos IgG e IgM e, assim, a ação lítica destas imunoglobulinas pela ativação do complemento (VIDARSON et al., 2001). Há ainda cepas de meningococos que produzem uma protease capaz de clivar moléculas de IgA secretórias, anulando com isto a ação antibacteriana da IgA na mucosa do trato respiratório (VIDARSON et al., 2001).

1d - Classificação

A *N. meningitidis* apresenta grande diversidade em suas estruturas da membrana externa, por isso o desenvolvimento de técnicas que permitem a diferenciação e classificação dessas estruturas bacterianas foi de suma importância no conhecimento das diferentes cepas que efetivamente causam a doença. No caso do meningococo, estes dados fornecem informações sobre o perfil das cepas que são observadas tanto em portadores como nos doentes. Além disso, auxilia no conhecimento filogenético, bem como na dispersão geográfica das cepas meningocócicas que são essenciais para o preparo de novas vacinas. A sorogrupagem do meningococo é feita normalmente por meio de aglutinação. A sorotipagem e a subtipagem são feitas principalmente pelo método de “Dot-blotting” (DE GASPARI et al., 1994; FRASCH et al., 1995), podendo-se empregar também o “Immunoblotting” e a contraímunoelctroforese (POOLMAN et al., 1982; DAVIES et al., 1990; DE GASPARI, 2000a).

Nas últimas décadas, com a implantação de metodologias que permitem o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e de novas técnicas de biologia molecular, houve um grande avanço nos esquemas de sorotipagem e subtipagem, o que possibilitou a obtenção de dados mais precisos. Atualmente os meningococos têm sido subdivididos pela análise clonal com base na variação do comportamento eletroforético de isoenzimas citoplasmáticas (ETs).

As estruturas da superfície externa do meningococo podem ser divididas em quatro grupos: polissacáride capsular (CPS), proteínas da membrana externa (OMPs), lipopolissacáride (LPS) e pili. As proteínas consideradas

INTRODUÇÃO

majoritárias e o LPS localizam-se abaixo da cápsula externa do meningococo. A grande variabilidade destes componentes entre os meningococos levou ao desenvolvimento do sistema de classificação do meningococo que tem se baseado no CPS, OMPs e LPS (TSAI et al., 1981).

A classificação do sorogrupo baseia-se na diferença do polissacáride capsular (CPS). Atualmente são definidos 13 sorogrupos de *N. meningitidis* B, que são: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z. As cápsulas das cepas do sorogrupo B e C são homopolímeros de ácido siálico ligado α 2,8 e α 2,9, respectivamente. Os outros são copolímeros do ácido siálico e monossacarídeos que estão ligados à glicose no caso do grupo Y ou galactose no caso do W135 (PELTOLA, 1998).

A membrana externa do meningococo contém de 3 a 5 proteínas majoritárias subdivididas em 5 classes estruturais que aparentemente estão correlacionadas com seus pesos moleculares definidos em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) de 46, 41, 38, 33 e 28 kDa, e são classificadas em classes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. (TSAI et al., 1981; POOLMAN, 1995). Os sorotipos e subtipos são definidos tomando-se com base a diferença dessas OMPs. A sorotipagem é feita baseando-se na diferença das proteínas da classe 2/3 e o subtipo é determinado pela diferença na proteína da classe 1. As cepas de meningococos nunca expressam as proteínas de classe 2 ou 3 simultaneamente. Estas proteínas funcionam como porinas e controlam o fluxo de íons na bactéria.

O imunotipo é determinado pela diferença na estrutura oligossacarídica do LPS (ZOLLINGER et al., 1991a; MORAN et al., 1994). Pelas técnicas desenvolvidas até hoje, foram analisados 12 imunotipos de L1 a L12 (VERHEUL et al., 1993; ZOLLINGER et al., 1991a). Os imunotipos de meningococos são definidos mais precisamente a partir da estrutura de seus oligossacárides. Esses oligossacárides são componentes dos lipopolissacárides situados na membrana externa, formando um núcleo de açúcares dentro dos lipossacarídeos (VERHEUL et al. 1993).

As cepas meningocócicas são designadas pelo sorogrupo, sorotipo, subtipo e imunotipo; por exemplo B:4:P1.15 L3,7,9,8, sendo B (sorogrupo), 4 (sorotipo), P1.15 (subtipo), L3,7,9,8 (imunotipos).

Apesar de todo avanço tecnológico muitos estudos têm que ser realizados ainda em relação aos sistemas de tipagem sorológica pois devido à alta variação antigênica presente intercepas e nas estruturas da membrana externa do meningococo, muitas cepas não podem ser tipadas pelos sistemas de sorotipagem existentes (FRASCH et al., 1995).

1e - Vacinas

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

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

Neutrófilos e macrófagos têm um papel essencial na imunidade inata, particularmente na infância quando anticorpos específicos estão ausentes

(ROSS et al., 1987; STEPHENS et al., 1986). Células polimorfonucleares de crianças de 2 anos têm a capacidade reduzida de migrar e de realizar a fagocitose. Este fato pode estar relacionado com o aumento da incidência da doença meningocócica nesta faixa etária. Também a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas de crianças é menos eficiente do que a apresentação por células de indivíduos adultos, sendo que a atividade funcional destas células não é alcançada até 1 ano de idade (ROSS et al., 1987).

Há tempos que vem se buscando uma preparação vacinal com grande aceitação e, o mais importante, segura e eficaz contra a *N. meningitidis* do sorogrupo B. Países como Brasil, Cuba, Canadá, USA, Holanda e Noruega, que tiveram epidemias durante as duas últimas décadas, têm investido bastante em pesquisas para vacina contra a doença meningocócica do sorogrupo B (PELTOLA 1998; POOLMAN, 1995; DE GASPARI, 2000c).

Diversos aspectos devem ser considerados na procura de imunoprofilaxia para *N. meningitidis* B (POLLARD & FRASCH, 2001):

-1º encontrar um antígeno que induza proteção à grande diversidade existente entre as cepas de meningococo B. Isto é fundamental no caso de uma epidemia onde aparecem diversos sorotipos, subtipos e imunotipos desse microrganismo.

-2º encontrar um antígeno que seja capaz de induzir anticorpos protetores. A atividade bactericida no soro tem sido fortemente relacionada com a imunidade à doença meningocócica. Anticorpos específicos e o sistema complemento têm um papel chave na defesa do hospedeiro contra o meningococo. Eles causam lise da bactéria, aumentam a fagocitose por monócitos ou leucócitos polimorfonucleares e/ou ainda neutralizam os efeitos mediados pela endotoxina bacteriana. Na doença meningocócica os anticorpos bactericidas são direcionados contra antígenos de superfície não capsulares.

A análise dos padrões da doença em indivíduos imunodeficientes demonstram o papel fundamental dos anticorpos e do sistema complemento no

combate à doença. A importância da indução de anticorpos bactericidas na eliminação do meningococo tem sido demonstrada indiretamente pela relação inversa entre atividade bactericida dos anticorpos antimeningocócicos e a diminuição da doença com o aumento da idade (NICHOLSON et al., 1979; ZOLLINGER et al., 1983; ROSS, 1987). Estudos mostram ainda que o meningococo varia muito na sua susceptibilidade à lise mediada pelo complemento. Segundo ROSS et al., 1987, as cepas de meningococo B são mais resistentes à atividade bactericida do que as do meningococos A e C e, por outro lado, tornam-se mais susceptíveis à ação de leucócitos polimorfonucleares.

-3º a proteção em crianças menores de 2 anos.

Crianças recém-nascidas são altamente resistentes à meningite meningocócica, tornando-se extremamente susceptíveis após os seis meses de idade, ou seja; há uma imunização passiva pela passagem através da placenta de imunoglobulinas, especialmente do isótipo IgG que permanecem até seis meses de idade. Dos 2 aos 12 anos há um aumento progressivo do título de anticorpos bactericidas contra a doença. GOLDCHENEIDER et al., 1969, observaram que a imunidade diminui entre 6 meses e 12 meses de idade e mostraram que o nível de anticorpos bactericidas é idade-dependente; isto é, conforme aumenta a idade, os níveis de anticorpos diminuem.

Os principais antígenos que têm sido estudados no desenvolvimento da vacina contra *N. meningitidis* B que contenham as características citadas acima são (DE GASPARI, 2000c):

- Polissacárides,
- proteínas classe 1 (44 – 47kDa), 2 (40 – 42kDa), 3 (37 – 39kDa), 4 (33 – 34kDa) e 5 (25-28kDa),
- IROMs proteínas (proteínas reguladas pelo ferro). As principais IROMs são: as *Lactoferrin binding protein* (também chamadas de Lbp ou Iro A (100kDa), *Iron restriction protein* ou Frp B (70kDa), *Transferrin-binding protein* ou Tbp 1 e Tbp 2. As Frp B, Tbp 1, Tbp 2 apresentam variação antigênica enquanto

as proteínas ligadas a lactoferrina são estáveis,

- Lipoproteínas, Lip ou H8 (20kDa) e de proteínas anaerobicamente induzidas como a CtrA; sendo essas últimas envolvidas no transporte de componentes da cápsula,
- Lipolissacáride (LPS).

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

Vacinas contendo antígenos polissacarídicos têm sido úteis na proteção contra os sorogrupos A e C. Anticorpos séricos específicos induzidos pelas vacinas polissacarídicas antimeningocócicas A e C são detectáveis uma semana após a aplicação. Os polissacárides capsulares dos sorogrupos A e C induzem principalmente anticorpos dos isótipos IgG e IgM com atividade bactericida. Estudos de imunogenicidade demonstram que polissacárides do sorogrupo A mostram-se mais imunogênicos do que o C em crianças maiores de 2 anos. (PELTOLA, 1998). Em adultos, o pico de anticorpos pós-vacinação acontece depois de 1 mês e permanece por aproximadamente 10 anos (PELTOLA, 1998). REINGOLD et al., 1985, investigando a imunogenicidade da vacina polissacarídica contra o sorogrupo A, verificaram uma eficácia de 90% no 1º ano após imunização, enquanto LAW et al., 1998, estudando a resposta à vacina em crianças acima e abaixo de 2 anos licenciada contra os sorogrupos A, C, e W135, observaram títulos $\geq 1:8$ em 50% das crianças entre 1 e 2 anos e 100% em crianças acima de dois anos de idade.

Polissacárides capsulares são úteis para utilização em uma preparação vacinal por ser um componente comum de um sorogrupo o que simplificaria a produção da vacina para o meningococo (POLLARD & LEVIN, 2000; POLLARD & FRASCH, 2001), entretanto para o sorogrupo B continua sendo um desafio em consequência da fraca imunogenicidade desses antígenos atribuída à tolerância imunológica devido à semelhança com o oligômero $\alpha(2\rightarrow8)$ do ácido siálico ou ácido $\alpha(2\rightarrow8)$ N acetil-neuramínico presente nos glicopeptídeos humanos e no tecido cerebral. Além disso, o polímero de ácido siálico constituinte deste componente é despolimerizado rapidamente pela neuraminidase nos tecidos e a estrutura conformacional do epítipo não é ideal para a ligação com anticorpos específicos (POLLARD & FRASCH, 2001).

Em vista das dificuldades encontradas na utilização de polissacárides capsulares do meningococo do sorogrupo B, várias estratégias têm sido desenvolvidas, como por exemplo a conjugação com proteínas que melhorem a imunogenicidade e solubilidade deste componente (MORLEY & POLLARD, 2002). JENNINGS et al., 1987b desenvolveram um polissacáride B modificado quimicamente que contém o grupo N-propionil no lugar do grupo N-acetil encontrado na posição C5 do resíduo de ácido siálico. Este polissacáride sintético foi conjugado ao toxóide tetânico e apresentou alta imunogenicidade em camundongos.

As proteínas da classe 1, 2 e 3 são porinas que se apresentam como trímeros, formando poros, permitindo que cátions e ânions passem por meio de difusão. Estas proteínas são divididas em PorA (proteína classe 1) e PorB. A PorB é subdividida, por sua vez, em PorB2 (proteína classe 2) e PorB3 (proteína classe 3). Sabe-se que a PorA apresenta uma variabilidade antigênica considerável devido à existência de duas regiões que são hipervariáveis. A maioria dos anticorpos é direcionada para uma dessas regiões hipervariáveis e estes são, na maioria das vezes, do isótipo IgG1 e IgG3 (MICHAELSEN et al., 2001). Outros estudos observaram ainda que a PorA é uma proteína que induz anticorpos bactericidas contra antígenos sorotipos específicos devido à

hipervariabilidade apresentada por esta proteína, verificando-se ainda que a proteção induzida pela PorA é observada em crianças maiores de 2 anos (POOLMAN, 1995; VAN DER VOORT et al., 2000; DE KLEIJN et al., 2002).

A PorB é uma proteína coexpressa juntamente com a PorA e tem quatro regiões variáveis. Os níveis de anticorpos para PorB aumenta gradativamente durante a infância chegando aos níveis encontrados em adulto aos 10 anos de idade. Os anticorpos são dos isótipos IgG1 e IgG3, que foram capazes de induzir proteção em crianças com idade inferior a dois anos, contudo os mesmos são dirigidos contra antígenos sorotipo específico, não induzindo anticorpos com reatividade cruzada para outras cepas de meningococos dificultando assim a sua utilização em uma preparação vacinal (MICHAELSEN et al., 2001). Recentemente MICHAELSEN et al., 2001, demonstraram que as proteínas da classe 3 não são acessíveis na bactéria íntegra para ligação com anticorpos, sugerindo que proteínas da classe 3 não induzem resposta protetora contra o meningococo.

DE KLEIJN et al., 2002, analisando a atividade bactericida e a distribuição dos isótipos IgG em crianças menores de 1 ano e em fase escolar, após duas ou três doses com uma vacina hexavalente com OMV contendo diferentes proteínas da classe 1, mostrou que esta preparação vacinal foi capaz de induzir anticorpos bactericidas principalmente do isótipo IgG2 e IgG3 e a distribuição dos isótipos foi idade-dependente.

Proteínas da classe 5 são proteínas de massa molecular entre 25 a 30kDa, apresentam uma grande variabilidade inter-cepa, isto é, uma cepa meningocócica pode expressar nenhuma ou até 4 tipos de proteína da classe 5. As proteínas da classe 5 são as principais responsáveis pelo contato da bactéria com o epitélio das mucosas. O que vem despertando o interesse para as proteínas da classe 5, apesar da hipervariabilidade, é seu potencial como antígeno vacinal. (WIERTZ et. al., 1996; JOLLEY et al., 2001). DANELLI et al., 1996, mostraram que os epítomos na proteína classe 5 são reconhecidos por anticorpos de indivíduos infectados com *N. meningitidis* e induzem uma forte

resposta de anticorpos do isótipo IgG. DE GASPARI & ZOLLINGER., 2001, com o uso de anticorpos monoclonais produzidos contra proteína da classe 5 mostraram que diferentes proteínas de classe 5 e 5C, que apresentam uma alta prevalência, seriam necessárias para o preparo de vacinas utilizando essas proteínas no Brasil.

As NspA (*Neisserial surface protein A*) são proteínas de membrana externa com massa molecular aparente de 22kDa, conservadas e estão sendo estudadas atualmente principalmente após o seqüenciamento genômico da *N. meningitidis* B cepa MC58. Esta proteína confere proteção a diferentes sorotipos e subtipos de meningococos do sorogrupo B e induz a produção de anticorpos bactericidas, contudo não é expressa por um terço das cepas meningocócicas analisadas (TETTELIN, 2000). MARTIN et al., 1997, mostrou que a imunização empregando NspA recombinante em camundongos BALB/c induziu proteção contra um desafio de uma dose letal de meningococo do sorogrupo B. MOE et al., 1999, em um estudo realizado com NspA avaliou a acessibilidade do epítipo confirmando que essas proteínas são altamente conservadas entretanto foram observadas diferenças na acessibilidade dos epítipos da NspA e susceptibilidade das diferentes cepas de meningococos a anticorpos bactericidas anti-NspA.

Uma possível alternativa para vacinas baseadas em OMV e OMPs, segundo FRASCH et al., 1995, está relacionada às proteínas da membrana externa com massa molecular aparente de 70 e 110 kDa. A *N. meningitidis*, quando cultivada em meio restrito de ferro, sintetiza estas proteínas de membrana externa, muitas das quais essenciais para o crescimento bacteriano (BRANDILEONE et al., 1994, PINTOR, et al., 1996). Dentre as proteínas reguladas pelo ferro temos as Tbp1 e Tbp2, FrpB, FbpA e FbpB. As Tbps são proteínas expressas quando o meningococo é crescido em condições deficientes de ferro, situação que ocorre normalmente "in vivo". Estas proteínas são capazes de induzir anticorpos bactericidas e apresentam uma limitada heterogeneidade antigênica, induzindo anticorpos de reatividade cruzada.

Anticorpos para estas proteínas são capazes ainda de bloquear a ligação de ferro pelo meningococo (POLLARD & FRASCH, 2001). As Tbp1 e Tbp2 são proteínas que induzem anticorpos de reatividade cruzada. Tanto a Tbp1 como a Tbp2 estão presentes na superfície da membrana externa bacteriana e são imunogênicas no homem e em animais. Anticorpos produzidos contra sua estrutura nativa são bactericidas e induzem resposta para cepas homólogas e muitas cepas heterólogas (ALA' ALDEEN, 1996). As Fbps são proteínas com massa molecular aparente de 37kDa e induzem anticorpos de reatividade cruzada (TRONCOSO et al., 2000).

Os antígeno H8 (Lip), proteínas que se ligam ao ferro e Lpb têm sido estudados como mais uns dos candidatos à componente vacinal (POOLMAN, 1995; PELTOLA, 1998; POLLARD & FRASCH, 2001). O antígeno H8 é uma lipoproteína que está na faixa de peso molecular aparente de 20 a 30 kDa sendo comum a todas as espécies de *Neisseria* patogênicas (meningococo e gonococo) e apresentando uma menor expressão em espécies comensais, como a *N. lactamica* e *N. cineracea*. WOODS et al., 1987, avaliaram a capacidade de proteção de um anticorpo monoclonal (do isótipo IgG) produzido para essa proteína. O anticorpo reduziu a bacteremia dos animais quando o meningococo foi administrado intraperitonealmente. Entretanto o grau de proteção foi baixo. BHATTACHARJEE et al., 1989, observaram que anticorpos anti-Lip obtidos de soros de pacientes convalescentes ou soro imune de coelhos não apresentam capacidade bactericida, mostrando a não efetividade desses componentes nas preparações vacinais contra o meningococo B.

Atualmente a maioria das pesquisas para o desenvolvimento de vacinas para o meningococo B estão também direcionadas para o uso de vesículas de membrana externa bacteriana liberadas pelo meningococo que contém as OMPs e LPS (ROSENQVIST et al., 1988; MANDRELL, et al., 1989; BJUNE et al., 1991; ROSENQVIST et al, 1995; ANDERSEN et al., 1997; TAPPERO et al., 1999). Geralmente as vacinas baseadas na OMVs são complexadas com um ou mais polissacárides capsulares para melhorar a solubilidade e

imunogenicidade deste componente. Apesar dos resultados promissores estas vacinas apresentam grande variação fenotípica dos antígenos de membrana externa e são consideradas OMPs específica. Essas vacinas induzem anticorpos bactericidas e são capazes de proteger contra doença meningocócica, em adultos e crianças. Entretanto, a limitação das mesmas pode-se atribuir ao fato dos antígenos apresentarem grande variabilidade antigênica, induzindo anticorpos protetores sorotipo específico, isto é, só protegem indivíduos infectados com as cepas utilizadas na preparação vacinal (cepa homóloga), não induzindo proteção contra cepas heterólogas (VERHEUL, et al., 1993; BOLESGO et al., 1995; CLAASEN et al., 1996, HANEBERG et al., 1998, DRABICK et al., 2000).

DE KLEIJN et al., 2000, desenvolveram uma vacina hexavalente composta por vesículas de membrana externa bacteriana de duas cepas do sorogrupo B (cepa H44/76) manipuladas geneticamente para expressar seis proteínas da classe 1 (PorA) presentes em cepas prevalentes na Europa ocidental. Esta vacina foi capaz de induzir anticorpos bactericidas em crianças maiores e menores de 5 anos e em adolescentes.

Com exceção da NspA, todas as proteínas expressas nas superfícies bacterianas descritas durante as três últimas décadas apresentam em comum uma grande variabilidade antigênica. No seqüenciamento recente do genoma de *N. meningitidis* do sorogrupo B, foram demonstrados genes codificadores para algumas proteínas que expressam em regiões conservadas (GNA33, GNA1162, GNA1220, GNA1946 e GNA 2001). Demonstrou-se por ELISA e Imunofluorescência (FACS) que estes antígenos reagiram com 31 cepas de diferentes sorotipos (TETTELIN et al., 2000). Os resultados sugerem que estas proteínas induzem imunidade contra a maioria das cepas de *N. meningitidis* do sorogrupo B. Recentemente, DE GASPARI, 2000, descreveu uma proteína de massa molecular de 50 kDa expressa na superfície bacteriana de *N. meningitidis* e que induz anticorpos com reatividade cruzada para diferentes

sorogrupos, sorotipos e subtipos de meningococos e com alta capacidade de proteção.

Estima-se que para conferir proteção em uma determinada área geográfica é necessário que a vacina desenvolvida apresente eficácia para 5 a 10 sorotipos diferentes. O problema é que, para que se atinja uma eficácia satisfatória, muitas vezes, o que se tem feito é a combinação de antígenos de cada uma das cepas de meningococos prevalentes em uma região. A combinação de várias OMVs, porém, leva a altos índices de LPS por dose de vacina, apresentando inaceitáveis efeitos colaterais, quando administrada pela via parenteral (PELTOLA, 1998).

Para se tentar resolver este problema tem-se construído cepas com toxicidade diminuída empregando-se técnicas de DNA recombinante. A criação de cepas deficientes ou mutantes da porção do lipídio A tem sido bastante investigada pela melhora da imunogenicidade, evitando-se assim o risco da produção de autoanticorpos (VERHEUL, 1993). Tentou-se também a remoção do LPS por meio de detoxificação, isto é, retirada do lipídio A utilizando-se tratamento com hidróxido de sódio, que remove a porção éster ligada aos ácidos graxos da molécula do lipídio A (ZOLLINGER et al, 1991b).

Investiga-se além dessas vacinas, preparações de oligossacárides derivados de LPS conjugados a OMPs (VERHEUL et al., 1993). O emprego dessas vacinas seria promissor visto que os mesmos promovem a indução de anticorpos neutralizadores de endotoxinas. O que falta nesses estudos, entretanto, é a seleção do oligossacáride ideal no que se refere à indução de anticorpos protetores de reatividade cruzada (POLLARD & FRASCH, 2001).

Consideraram também esquemas de imunização empregando-se o meningococo inteiro inativado. Tal procedimento apresenta a vantagem de possuir todos os antígenos descritos anteriormente, entretanto, um dos grandes problemas apresentados por esta preparação vacinal seria os níveis inaceitáveis de toxicidade devido à presença de LPS. A recente descrição de uma cepa de meningococo deficiente em LPS seria uma alternativa para o

desenvolvimento de uma vacina utilizando o microrganismo inteiro, bem como obtenção de vesículas mutantes com menor toxicidade (VAN DER LEY et al., 2001).

As vacinas norueguesas, cubanas e chilenas existentes até o momento apresentam resultados controversos e muito questionáveis dependendo da região geográfica onde são usadas (PELTOLA, 1998; POLLARD & FRASCH, 2001).

A vacina cubana é constituída por proteínas da membrana externa do grupo B (50 µg) conjugada com polissacarídeo capsular do sorogrupo C (50 µg). Esse complexo protéico é adsorvido com hidróxido de alumínio (2 mg) (PELTOLA, 1998).

Tanto a vacina cubana quanto a norueguesa foram preparadas a partir de extratos obtidos de vesículas de membrana externa bacteriana do meningococo B com o detergente desoxicolato associadas ao polissacáride do meningococo C (VERHEUL et al., 1993; PELTOLA, 1998).

MILAGRES et al., 1994, 1996, em estudo realizado visando a determinar a eficácia no Brasil da vacina cubana VAMENGOC-BC, preparada com proteínas de membrana externa da cepa B:4:P1.15 e polissacáride C que foi aplicada em crianças de 3 a 7 anos de idade num programa de vacinação realizada no Estado de São Paulo entre 1989-90, mostraram que anticorpos bactericidas foram produzidos. Entretanto os autores observaram neste trabalho que a indução de anticorpos bactericidas foi idade-dependente. Observaram ainda que a eficácia foi de 74% para crianças acima de 4 anos e 47% para crianças na faixa etária de 2 a 4 anos. Em outro estudo, empregando a mesma vacina em Cuba, demonstrou-se proteção em crianças de 10 a 14 com uma eficácia de 83% (SIERRA et al., 1990).

A vacina norueguesa obtida a partir de proteínas de membrana externa da cepa B:15:P1.16 (H44/76) apresentou eficácia de 57,2% na Noruega sendo considerada ineficiente para imunização em massa. (VERHEUL et al., 1993; PELTOLA, 1998).

A vacina chilena preparada com agregados protéicos da cepa B:15:P1.3, L3,7 apresentou eficácia de 51%, em voluntários de 5 a 21 anos e em 70% das crianças abaixo de 4 anos não apresentou proteção BOLESGO et al., 1995.

1f - LPS

Dentre os quatro diferentes grupos de estruturas da superfície externa bacteriana identificadas no meningococo, um que podemos destacar é o LPS. O LPS dos meningococos está presente principalmente na membrana externa bacteriana, entretanto é liberado também para o meio externo durante a fase-logaritmica de crescimento "*in vitro*" e "*in vivo*" deste microrganismo. (VERHEUL et al., 1993).

O LPS de todas as enterobactérias é composto de três regiões: (1) uma região basal glicolípídica (lipídio A) que é ancorada à membrana externa e aos quais é ligada; (2) uma região oligossacarídica conhecida como core; (3) uma região oligossacarídica repetida ligada à N-acetilglicosamina da região oligossacarídica anteriormente descrita, que provém da O-especificidade antigênica (GRIFFISS et al., 1987). As atividades tóxicas atribuídas ao LPS e freqüentemente associadas à doença meningocócica são mediadas pelo lipídio A. Esse componente do LPS consiste de um dímero N-acetilglucosamina fosforilada com 6 a 7 ácidos graxos, sendo uma estrutura altamente conservada entre as bactérias gram-negativas. A região do core consiste de pequenos açúcares geralmente heptoses que se ligam à posição 6 N-acetilglucosamina fosforilada do lipídio A (JENNINGS et al., 1987a).

O LOS, porção polissacarídica constituinte do LPS, contribui na habilidade dos meningococos de resistirem à atividade bactericida mediada pelo complemento e também pode se ligar a lecitinas expressas pelo hospedeiro contribuindo assim para a adesão bacteriana (ESTABROOK et al., 1997). HAMMERSCHMIDT et al., 1996, demonstraram que só cepas mutantes de *N. meningitidis* B que não apresentam cápsula foram capazes de penetrar em

células epiteliais e que um grupo menor dessas bactérias não encapsuladas foi inativada, isto é, perderam a capacidade de invasão, pela inserção de uma sequência dentro do gene *Sia A*, responsável pela biossíntese do ácido siálico. A sialilação do LOS é variável e é dependente da cepa e condições de crescimento (TSAI et al., 1981). A ausência do gene responsável pela enzima que realiza a sialilação (a *Lsf*), do substrato e do receptor desta enzima causam a falha do resíduo de ácido siálico (TSANG et al., 2001).

Dois tipos de epítomos podem ser distinguidos dentro do LPS meningocócico: (I) epítomos imunotipo-específico e (II) epítomos de reatividade cruzada (VERHEUL et al., 1993). Os epítomos imunotipo específico formam a base da classificação dos imunotipos meningocócicos.

As cepas de *N. meningitidis* possuem uma grande heterogeneidade de estruturas de LPS, foram classificadas em 12 imunotipos (POLLARD & FRASCH, 2001) e são compostas de um a seis componentes com massa molecular variando de 3.2 a 5.1 kDa. As diferenças entre as moléculas de LPS expressas por uma cepa ou as diferenças entre os doze imunotipos podem ser encontradas na porção oligossacarídica da molécula do LPS. A maioria das cepas meningocócicas freqüentemente expressa mais do que um epítomo imunotipo-específico de seu LPS, o que levou à classificação por exemplo de cepas como L3,7,9 ou L1,8 (VERHEUL et al., 1993).

Uma característica importante do LPS é a alta freqüência de "switching" apresentado por essa molécula (MORAN et al, 1994). JENNINGS et al., 1999, num estudo investigando a base genética das diferenças estruturais entre os imunotipos, mostrou o repertório de fase variação do gene *lgt*, responsável pela síntese de LPS.

O imunotipo L8 está associado com bandas de baixo peso em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com aproximadamente 3,6 kDa e o imunotipo L3,7 está na faixa de massa molecular aparente de 4,5 kDa (MORAN et al, 1994).

A estrutura do L8 parece diferir do L3,7,9 na ausência de dois açúcares da porção terminal do lacto N-neotetraose tetrassacáride, o que leva o L8 a possuir um oligossacáride mais curto do que o L3,7,9 (MORAN et al., 1994).

Trabalhos usando camundongos como modelo revelaram que meningococos do imunotipo L8 predominam na nasofaringe, enquanto que o imunotipo L3,7,9 são geralmente mais encontrados no sangue de animais infectados. MORAN et al., 1994, mostraram que cepas de meningococos do imunotipo L3,7,9 são relativamente resistentes à ação de complemento comparado com o imunotipo L8, enquanto VIRJI et al., 1995, observaram que o imunotipo L3 é sialilado e o imunotipo L8 não é sialilado. Esta diferença na sialilação foi atribuída a diferenças na capacidade de aderência e invasão em células de modelos experimentais.

Quanto à utilização do LPS como componente vacinal, o que tem chamado a atenção principalmente nos estudos de vacinas para a *N. meningitidis* B é a função adjuvante atribuída a essa molécula (MELANCON et al., 1983; GRIFFISS et al., 1987; ZOLLINGER et al., 1991b; STEEGHS et al., 1999).

EISENSTEIN et al., 1982, mostraram que camundongos não-respondedores para LPS (C3He/J), tornando-se mais susceptíveis à infecção por *Salmonella*, mostrando a importância desta estrutura na indução de uma resposta imune.

MICHAELSEN et al., 2001, mostram que os epítomos que definem os sorotipos 4 e 15 na proteína PorB3 são pouco acessíveis para ligação de anticorpos e aparentemente o LPS pode influenciar a exposição de várias proteínas do meningococo. Neste trabalho eles observaram que os epítomos da PorB3 foram melhor expostos nas cepas de bactérias que expressavam L8. DIXON et al., 2001, mostram que o LPS meningocócico é um componente chave na indução de resposta de células dendríticas e que o LPS é requerido para produção de citocinas, especialmente IL-12.

Um dos possíveis mecanismos do LPS é que ele seria um potente ativador policlonal de células B, atuando como antígeno T-independente. Mc GHEE et al., 1979, mostraram que tanto linfócitos T como macrófagos são ativados pelo LPS e regulam a resposta de células B.

A atividade adjuvante e a toxicidade do LPS parecem estar relacionadas ao lipídio A. A quantidade de ácidos graxos esterificados no lipídio A e também o padrão de fosforilação é que determinam estas atividades do LPS (GRIFFISS et al., 1987). Na característica adjuvante do LPS devemos considerar ainda as diferenças intercepas e interespecies que parecem influenciar também o comportamento imunológico e imunoquímico do LPS. Além disso, temos a influência das condições de crescimento da bactéria (GRIFFISS et al., 1987).

MORAN et al., 1994, observaram que mudanças na expressão de LPS podem afetar a sensibilidade de uma cepa quanto à atividade bactericida de diferentes maneiras.

BHASIN et al., 2001, investigando o papel do LPS na resposta humoral contra porinas da cepa H44/76 mostraram que a presença do LPS em conjunção com a PorB na superfície externa foi capaz de aumentar a resposta imune direcionada para esta proteína.

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

Apesar do LPS apresentar características promissoras para o desenvolvimento de uma vacina, seu efeito tóxico continua sendo um grande problema. Nesses estudos vários métodos químicos e técnicas de transformação têm sido utilizados na tentativa de se conseguirem cepas com toxicidade diminuída. Diversos métodos no estudo da vacina para o meningococo B vêm sendo empregados. Neste sentido, existem preparações

vacinais que apresentam quantidades de LPS variáveis (2 a 15%). Apesar desta variação, o grande desafio é a obtenção de uma preparação vacinal livre ou com quantidade inferior de a 1% de LPS. Estudos vêm sendo realizados empregando LPS detoxificado (sem o lipídio A) ou oligossacárides derivados de LPS combinados a proteínas de membrana externa bacteriana (ZOLLINGER et al., 1991b). RIFKIND, 1967, demonstrou a prevenção da letalidade ocasionada pelo LPS em camundongos através da utilização de coluna de Polimixina B para retirada do LPS das preparações antigênicas.

PIZZA, et al., 2000, realizaram recentemente o seqüenciamento genômico da cepa de *N. meningitidis* MC58 para identificar possíveis candidatos vacinais. Com este trabalho foram identificadas três ilhas de transferência de DNA: duas que contém genes codificadores envolvidos na patogenicidade, entre eles os genes produtores do polissacárides capsulares e do LPS, ambos como se sabe críticos na patogenicidade da infecção por meningococo, já que a eficiente replicação do meningococo e elaboração da parede celular e outras moléculas bacterianas, como o LPS, causam a inflamação das meninges do hospedeiro (VAN PUTTEN, 1995). Este achados podem contribuir principalmente no desenvolvimento de uma vacina para *N. meningitidis* B sem os riscos dos efeitos tóxicos ocasionados por essa molécula.

1g - A imunidade mucosa

A superfície mucosa, que recobre o trato respiratório, intestinal e genito-urinário, possui uma série de mecanismos inespecíficos e específicos que podem prevenir a entrada de microrganismos para os espaços internos do organismo. Este conjunto de fatores compõe o Sistema Imune Secretor ou Sistema Imune das Mucosas (KAGNOFF & MURAY , 1987).

Os mecanismos inespecíficos são compostos pela barreira promovida pelo muco, pela camada de glicocálice, pelo fluxo de secreções e excreções, pelo muco ciliar e peristáltico, que reciclam o conteúdo da luz e removem material não ligado à superfície epitelial, bem como por uma série de substâncias com atividade antimicrobiana, como lisozima, lactoferrina, o interferon e outras (KAGNOFF & MURAY, 1987; STROBER & JAMES, 1991).

Além dos fatores de defesa inespecíficos, o sistema imune das mucosas possui o tecido linfóide associado às mucosas, denominado genericamente de MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue). O conhecimento sobre as estruturas que compõem o MALT advém em grande parte dos modelos murinos. Estes modelos ajudam a compreender as interações celulares que ocorrem no nível do sistema imune das mucosas, embora muitos aspectos necessitem de mais estudos (STROBER & JAMES, 1991).

O MALT compreende o tecido linfóide presente nas mucosas dos ductos pancreático e biliar, ocorrendo uma rede de interações por meio de células linfóides que circulam entre vários sítios (PARMELY & BEER, 1977; VAERMAN, 1987). O MALT pode se apresentar como tecido linfóide organizado, formando áreas de acúmulo de tecido linfóide na submucosa, bem como de material linfóide difusamente espalhado entre as células epiteliais e na lâmina própria (STROBER & JAMES, 1991).

A região do MALT na mucosa brônquica é denominada de tecido linfóide associado aos brônquios ou BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*); e a região equivalente na mucosa intestinal é chamada de GALT (*gut-associated lymphoid tissue*) e nasal NALT (*nasal-associated lymphoid tissue*). Nesses compartimentos encontram-se as áreas de tecido linfóide organizado, como as placas de Peyer no trato intestinal, principalmente na região ileal, apêndice e cólon. Nas outras áreas do MALT predomina uma distribuição de tecido linfóide ao longo da lâmina própria (KAGNOFF & MURAY, 1987, STROBER & JAMES, 1991).

As placas de Peyer são formadas por três regiões: 1) a cápsula composta de células epiteliais associadas ao folículo, ricas em antígenos de histocompatibilidade classe II e de células M, que mantêm estreito contato com linfócitos adjacentes, parecendo ser um local de entrada de alguns microrganismos 2) o folículo formado pelo acúmulo de células, na sua maioria linfócitos B IgA⁺; 3) a zona interfolicular T-dependente composta por linfócitos T alfa-beta CD4⁺ e CD8⁺ (na razão 2:1), macrófagos e células dendríticas (KAGNOFF & MURAY, 1987; STROBER & JAMES, 1991)

O tecido linfóide difuso é composto por linfócitos intraepiteliais (LIE) e linfócitos da lâmina própria. Em condições fisiológicas há presença de 6 a 40 LIE por células epiteliais, havendo um aumento desse número no curso de processos inflamatórios. Linfócitos T intraepiteliais apresentam predominantemente o receptor gama-delta e fenótipo tipo CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, cujos mecanismos de ativação e função efetora, ainda pouco conhecidos, parecem ser distintos daqueles apresentados pelos linfócitos T existentes na lâmina própria. Na lâmina própria, ocorrem linfócitos B e T, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos espalhados no tecido conjuntivo rico em vasos linfáticos e sanguíneos. O fenótipo dessa população celular é semelhante ao das células presentes nas placas de Peyer (KAGNOFF & MURAY, 1987; STROBER & JAMES, 1991). Os linfócitos encontrados na lâmina própria apresentam moléculas de membrana com características de células em estado de ativação (com aumento da expressão do receptor para IL-2), sugerindo-se que essas regiões do MALT constituam locais de resposta imune eferente, por serem povoados por células pré-ativadas originárias do tecido linfóide organizado (STROBER & JAMES, 1991).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) representa o maior acúmulo de linfócitos do organismo com síntese preferencial de S-IgAs (IgA secretória) (HANSON et al., 1993; MESTECKY & MCGHEE, 1987). Os anticorpos presentes nas mucosas interagem não apenas com microrganismos que chegam à luz, como também com materiais exógenos da dieta alimentar

(BURGIO et al., 1980; MESTECKY et al., 1980; MCNABB & TOMASI, 1981; KWASNISH & STROBER, 1983; MESTECKY & MCGHEE, 1987). Estudos realizados por VANDERHEIDJEN et al., 1987, em camundongos, mostraram a ocorrência de um grande número de plasmócitos produtores de IgAs espalhado ao longo do duodeno e jejuno. No homem, estas regiões são responsáveis pela absorção de antígenos alimentares e podem ser colonizadas por alguns microrganismos patogênicos (KAGNOFF & MURAY, 1987).

A produção diária de IgAs, nas mucosas, excede a todas as outras classes de imunoglobulinas, porém a sua vida média é a mais curta. Ela é encontrada na forma de duas subclasses: IgA₁ e IgA₂. A IgA₁ possui na região da dobradiça, uma sequência de aminoácidos que podem ser clivados por proteases bacterianas. Esta sequência está ausente na IgA₂. No GALT, 35% a 60% das células são produtoras de IgA₂, com predomínio no íleo e no intestino grosso. Na glândula salivar, 37% dos linfócitos B são IgA₂⁺ (MESTECKY et al., 1980; MCNABB & TOMASI, 1981; KAWANISHI & STROBER, 1983; TOMASI & PLAUT, 1985; BRANDTZAEG et al., 1987). Acredita-se que a IgA seja, evolutivamente, a mais nova das imunoglobulinas parecendo ter a IgA₂ surgido após a IgA₁, devido às pressões evolutivas exercidas pela interação com a microbiota. Esta idéia é sugerida pelo fato da estrutura lipolissacarídica (LPS) das bactérias gram-negativas induzir, preferencialmente, a síntese de IgA₂. Além disso, a IgA₂ possui na composição de seus carboidratos uma quantidade maior de resíduos de manose do que a IgA₁ (CONLEY & DELACROIX, 1987; MESTECKY, 1987; HANSON & BRANDTZAEG, 1989; LADJEVA et al., 1989). A existência dos resíduos de manose na estrutura pode inibir a aderência bacteriana, pois a manose é um importante açúcar com provável envolvimento no mecanismo de ação bacteriana por meio de fímbrias (OFEK et al., 1977, WOLD et al., 1990).

As mucosas formam a via natural de entrada de antígenos que podem penetrar através dos epitélios associados aos folículos (células M), permitindo assim a interação com células acessórias residentes (macrófagos e células

dendríticas) e com as células linfóides (TOMASI & PLAUT, 1985; BRANDTZAEG et al., 1987; MESTECKY, 1987).

As bactérias são capazes de se fixar e de crescer na maioria das superfícies. Sabe-se, atualmente, que o primeiro passo para o estabelecimento de um processo infeccioso é o contato do microrganismo com a camada de muco que recobre a superfície epitelial de uma mucosa do hospedeiro. A aderência da bactéria a esse tecido requer o estabelecimento de ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície da bactéria e da célula epitelial. Assim, certas espécies patogênicas como os *Mycoplasma* aderem a células epiteliais da traquéia, o que não ocorre com as espécies não patogênicas. A capacidade de aderir a células de mucosa também parece ser fator importante na colonização da nasofaringe por *Streptococcus pneumoniae* e por *Haemophilus influenzae*, precedendo a otite média. Estudos realizados com roedores mostraram que amostras altamente patogênicas de *Streptococcus mutans* são importantes como fator etiológico da cárie dentária, com formação de grandes massas bacterianas na superfície dos dentes, ao contrário das não patogênicas. Amostras virulentas de *Shigella* e *E. coli* enteropatogênica comportam-se de maneira semelhante, aderindo à superfície do intestino delgado melhor do que amostras não virulentas (HUSBAND et al., 1993).

Alguns autores observaram que a exposição primária da mucosa a alguns antígenos, com subsequente “booster” por via parenteral, confere imunidade local, ao passo que a sensibilização inicial por via parenteral leva à supressão na mucosa por longo período de tempo (OGRA et al., 1983, BIENESTOCK et al., 1987, MESTECKY, 1987).

A compartimentalização do SIMC é sustentada por vários estudos. De acordo com este conceito, a própria estimulação de um sítio indutor de mucosa pode induzir respostas imunes em outros sítios. Entretanto, a estimulação ou diferenciação de sítios indutores da mucosa induz respostas imunes que são distribuídas irregularmente em diferentes sítios efetores. Geralmente, as

respostas imunes são fortes perto de sítios efetores de mucosa, ou naqueles relatados nos locais dos vasos linfáticos (RUSSELL & WU, 1991; WU & RUSSELL, 1993; HANEBERG et al., 1994; MOLDOVEANU et al., 1995; QUIDING-JARBRINK et al., 1995).

O uso das novas tecnologias no desenvolvimento de vacinas só vem reforçar a importância de se levar em consideração a via natural de entrada do patógeno e utilizá-la como estudo quando se pretende avaliar a resposta imune a um determinado agente patogênico.

O NALT em roedores é considerado ser o equivalente ao anel de Waldeyer em humanos (KUPER et al., 1992) e uma faixa do tecido linfóide não encapsulado sustentando o epitélio na porção ventral da passagem posterior nasal. A morfologia celular, o fenótipo, o desenvolvimento, e a estrutura do NALT, bem com a aderência dos linfócitos neste tecido têm sido estudados em roedores (KOORNSTRA et al., 1992; HAMELEERS et al., 1989). Imunização efetiva de roedores pela via i.n. foi considerada ser o resultado da estimulação do NALT, entretanto, a resposta imune do NALT, quando exposto ao antígeno, não está ainda totalmente esclarecida (KUPER et al., 1992).

Estima-se que 60 a 70% das células linfóides humanas estejam associadas a essa superfície, salientando a relevância da estimulação da resposta neste compartimento (MESTECKY, 1987). Para realizar a função de prevenir a entrada do microrganismo e assim impedindo sua circulação e proliferação, nosso corpo dispõe ainda de vários fatores como: movimentos peristálticos e ciliares que mantêm o fluxo de constituintes da mucosa, reduzindo a interação de patógenos com células epiteliais, secreções que formam uma barreira entre o patógeno, e enzimas (como lisozimas, lactoperoxidase) que têm efeito inibitório sobre microrganismos.

Sabendo-se que a via aérea superior é o principal meio pelo qual a *N. meningitidis* coloniza a nasofaringe humana, acredita-se que a imunidade de mucosa nesta porta de entrada seja fundamental na indução de uma resposta protetora contra o meningococo. A IgA tem sido detectada nas secreções

nasais de pacientes que se curaram da doença e em voluntários que foram imunizados pela via nasal.

Vários trabalhos descritos na literatura, vêm mostrando que a via de imunização nasal é um bom local a ser escolhido no desenvolvimento de uma vacina para *N. meningitidis* B. Hoje observamos na literatura que grupos de pesquisa como dos Estados Unidos e Noruega, que há mais de 20 anos trabalham com vacinas para o meningococo do sorogrupo B administradas pela via parenteral, também estão investigando alternativas através da imunização intranasal, pois até o momento não há uma vacina efetiva para *N. meningitidis* B (HANEBERG et al., 1998; DRABICK et al., 2000, KATIAL et al 2002). Entretanto dois pontos importantes têm sido levados em consideração nesses estudos: a indução de anticorpos de reatividade cruzada entre diferentes sorotipos e subtipos de *N. meningitidis* e indução de anticorpos com atividade bactericida. Sendo assim a continuidade de estudos que visem à procura de novos antígenos presentes na membrana externa bacteriana que possam estar envolvidos no mecanismo de proteção para esse patógeno é de extrema importância.

SAUNDERS et al., 1999, observaram que NOMV (vesículas de membrana externa nativa) induzem altos títulos de anticorpos bactericidas no soro e também uma resposta local nos pulmões quando administradas pela via intranasal. Neste trabalho SAUNDERS et al., 1999, observaram que a imunização intranasal parece ter impedido a toxicidade causada pelo LPS do que quando a mesma preparação antigênica foi administrada pela via intraperitoneal. BAKKE et al., 2001, mostraram que OMV administrada pela via intranasal possui estruturas necessárias para indução tanto de resposta imune de mucosa como sistêmica e para desenvolvimento de memória imunológica. HANEBERG et al., 1998, administrando uma vacina consistindo de OMVs de *N. meningitidis* B (B:15:P1.7) em voluntários humanos verificaram que houve desenvolvimento de uma resposta de anticorpos do isótipo IgA nas secreções nasais e na saliva que persistiram por um período de 5 meses. Eles verificaram

que a via de imunização intranasal inicia uma resposta sistêmica e capaz de induzir anticorpos bactericidas, entretanto em menores títulos que quando administrada pela via intramuscular.

Além de oferecer proteção, a imunização pela vias de mucosa tem sido também uma alternativa para impedir o efeito tóxico do LPS (SAUNDERS et al., 1999; KATIAL et al., 2002).

Em razão da alta incidência, alta mortalidade e custos com a doença meningocócica tem-se investido muito na imunoprofilaxia. BOS et al., 2002, mostraram, através da avaliação do custo-benefício da vacina hexavalente com OMV que está sendo desenvolvida na Holanda, que os custos hospitalares com internação e tratamento de seqüelas deixadas pela doença meningocócica são maiores que os gastos com programa de imunização.

Embora vacinas administradas pela via parenteral apresentem uma boa eficácia elas previnem particularmente doenças sistêmicas causadas por patógenos invasivos, entretanto não são efetivas contra microrganismos que penetram pela superfície mucosa.

OBJETIVOS

• Gerais

O objetivo do presente estudo é avaliar a especificidade e capacidade protetora dos anticorpos induzidos principalmente pela via de imunização intranasal em camundongos BALB/c imunizados com OMC (Outer membrane components) das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9[↑], B:4:P1.15 L3,7,9[↓], B:4:P1.15 L8[↑] e B:4:P1.15 L8[↓] que foram obtidas através da seleção por *colony-blot* utilizando anticorpos monoclonais contra os imunotipos de LPS L3,7,9 e L8 de *N. meningitidis* B.

• Específicos

- Estudo da produção de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal e intramuscular com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9[↑], B:4:P1.15 L3,7,9[↓], B:4:P1.15 L8[↑] ou B:4:P1.15 L8[↓].
- Estudo de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA de reatividade específica e cruzada para antígenos de *N. meningitidis* de diferentes sorogrupos, sorotipos e subtipos por meio de ELISA e "Immunoblotting".
- Detecção por meio de ELISA e análise da especificidade por "Immunoblotting" dos anticorpos presentes nas salivas dos camundongos imunizados pela via intranasal e intramuscular com OMC das cepas selecionadas de *N. meningitidis* B:4:P1.15.
- Estudo da persistência de memória imunológica em camundongos imunizados pela via intranasal.

OBJETIVOS

- Avaliação da atividade de destruição de meningococos (atividade bactericida) dos anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados pelas vias intranasal e intramuscular.

Esquema experimental

Cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9,8

⇓
Seleção por "colony-blot"

⇓ ⇓ ⇓ ⇓
B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15
L3,7,9↑ L3,7,9↓ L8↑ L8↓

⇓

Extração de OMC ("Outer Membrane Complex") das cepas selecionadas

⇓
Imunização dos camundongos

⇓
Via de imunização intranasal

⇓
Via de imunização intramuscular

⇓ ⇓ ⇓ ⇓ ⇓ ⇓ ⇓ ⇓
B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15 B:4:P1.15
L3,7,9↑ L3,7,9↓ L8↑ L8↓ L3,7,9↑ L3,7,9↓ L8↑ L8↓

⇓
Obtenção de soros e salivas dos camundongos imunizados

⇓
Soro

⇓
Saliva

⇓
Via Intranasal
(obtidos 35 dias, 4 meses
e 1 ano após imunização)

⇓
Via intramuscular
(obtidos 30 e 60 dias
após imunização)

⇓
Obtidas após 1 ano da imunização
pela via intranasal)

⇓
ELISA
(usando "whole-cells"
das cepas homólogas e
heterólogas)

⇓
"Immunoblotting"
(usando "whole-cells" e
OMC das cepas homólogas
e heterólogas)

→

Atividade
bactericida

II- MATERIAIS E MÉTODOS

2a. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas adultas pesando entre 20 a 25 g. Todos os animais provieram do Biotério do Instituto Adolfo Lutz São Paulo, SP.

2b. Cepas de bactérias

Em nossos estudos foram utilizadas as cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15, B:4:P1.9, B:14:NT, B:4:NT e C:2a:P1.2. Estas cepas foram escolhidas para nossas investigações por serem prevalentes em nosso país e foram obtidas de pacientes portadores de doença meningocócica durante as epidemias ocorridas no Brasil desde 1988. As cepas de *N. meningitidis* encontravam-se liofilizadas e foram reativadas em ágar-chocolate com base Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). O grau de pureza das suspensões bacterianas foi verificado pela técnica de Gram.

As cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15, B:4:P1.9, B:14:NT, B:4:NT e C:2a:P1.2 foram fornecidas pela Coleção de Culturas de Bactérias do Instituto Adolfo Lutz e a cepa B:4:P1.15 (44/89) utilizada no ensaio bactericida foi gentilmente cedida pela Dra. Cecília O. Gorla, da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

2c. Crescimento bacteriano

Partindo do crescimento em ágar-chocolate, em base Mueller-Hinton, as cepas foram em seguida semeadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro

descartáveis (Costar, Cambridge, MA, EUA), uma placa por cepa, contendo ágar-soro preparado com base ágar soja e trypticaseína (Difco Laboratories Detroit, MI, EUA) enriquecido com 1% de soro de cavalo (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e incubadas para crescimento em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, Detroit, MI, EUA) por aproximadamente 24 horas.

2d. Purificação do LPS dos imunotipos L8 e L379 da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15

A purificação desses imunotipos foi feita nos Estados Unidos (DE GASPARI et al., 1995) no Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC. O LOS foi obtido das OMVs por extração com fenol, seguido de purificação por filtração em gel (Sephacryl S-300). As frações de LOS foram monitoradas pelo conteúdo de kDO e precipitadas com etanol 80% e NaCl 0,25 M. As amostras foram então dissolvidas em água destilada, liofilizadas e conservadas a -20°C.

2e. Colonyblot

Para o ensaio de "colonyblot" as bactérias foram plaqueadas e distribuídas de maneira homogênea com o auxílio de alça do tipo L (Drigalsky) em Placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com 1% de soro de cavalo (ágar-soro). As bactérias foram plaqueadas e incubadas por 18 horas à 37°C. Após crescimento de aproximadamente 18 horas a 37°C foi preparada uma suspensão bacteriana com o objetivo de se obter uma concentração correspondente a D.O.= 1,0 em um comprimento de onda de 650 nm (CELM - modelo E2250). As suspensões

bacterianas com D.O. 1,0 foram então plaqueadas e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, as membranas de nitrocelulose (HATF - de 90 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 µm, Amsham Pharmacia, Upsala, EUA) foram colocadas em contato com as placas para se obter uma cópia das bactérias crescidas. Tendo obtido as cópias das culturas das placas, as membranas foram colocadas a 37°C por 10 minutos. O bloqueio dos sítios ativos remanescentes das membranas foi realizado com leite desnatado à 5% (Molico - Nestlé do Brasil) durante duas horas. Posteriormente a uma nova lavagem com PBS, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais para epítomos de LPS, (6E7-10-L8) e (4BE12-C10-L3,7,9), gentilmente cedidos pelo Dr. Wendell Zollinger, do Walter Reed Army, Institute of Research, Maryland, EUA. Os anticorpos monoclonais foram utilizados nas diluições previamente padronizadas (6E7-10-L8, 1:10.000 e 4BE12-C10-L3,7,9, 1:20.000). As membranas com os monoclonais foram incubadas por aproximadamente 18 horas. A seguir, novas lavagens com PBS foram realizadas e o anticorpo anti-IgG (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) conjugado à peroxidase foi adicionado (1:2.000, diluído em solução de leite desnatado à 2,5%) durante duas horas. A reação foi revelada utilizando-se diaminobenzidina - DAB (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), 5 mg de DAB em 30 mL de solução tamponada PBS e 150 µL de H₂O₂. Depois da reação, as colônias que apresentaram maior ou menor coloração na membrana foram selecionadas das placas e a seguir semeadas e crescidas como descrito anteriormente e mantidas em solução de preservação (leite desnatado a 10%) em freezer a -70°C.

2f. Citometria Fluxo

A porcentagem de LPS presente nas cepas B:4:P1.15 selecionadas foi avaliada por citometria de fluxo. Para este ensaio, suspensões de células

bacterianas íntegras das cepas B:4:P1.15 selecionadas para LPS foram lavadas e ressuspensas à D.O. 1,0 a 650 nm em salina (S), contendo soro albumina bovina (SAB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) a 1%. Posteriormente, 100 µL da suspensão de células bacterianas íntegras foi misturada aos anticorpos monoclonais diluídos à 1:1000 em 200 µL de S/SAB e incubados a 37°C por 30 minutos. Como controle negativo empregou-se anticorpos monoclonais para proteínas não relacionadas. Em seguida, as bactérias foram lavadas duas vezes com S/SAB e incubadas com 200 µL de FITC ligado a um anticorpo secundário (anticorpo de camelo anti-IgG de camundongo ligado à fluoresceína (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, EUA) por 30 minutos a 4°C. Procedeu-se a nova lavagem das bactérias, sendo estas depois ressuspensas com 1 mL de S e analisadas pelo citômetro de fluxo (FACsorter, Becton-Dickinson, San Jose, Califórnia).

2g. Extração das proteínas de membrana externa

Para a imunização dos grupos de camundongos BALB/c foi feita a extração das OMC das cepas B:4:P1.15 L379↑, B:4:P1.15 L379↓, B:4:P1.15 L8↑ e B:4:P1.15 L8↓ anteriormente selecionadas por "colony blot". Primeiramente, as cepas de bactérias foram crescidas em ágar base "Müller-Hinton" com 1% de soro de cavalo. Após o período de crescimento de 18 horas em placas, as bactérias foram transferidas para balões contendo 500 mL de caldo "Müller-Hinton" sob agitação e incubadas por um novo período de 18 horas a 37°C. O complexo de membrana externa das diferentes preparações bacterianas de *N. meningitidis* foi purificado empregando-se a técnica descrita por DE GASPARI et al., 1990. As suspensões bacterianas foram transferidas para tubos Falcon (Costar, Cambridge, MA, EUA) e centrifugadas em 10.000 g. a 4°C (Beckman, EUA; Centrifuge Model. J2 MC) por 30 minutos. Ao sedimento foi acrescentado 20 mL de solução de cloreto de lítio estéril a 0,1M e

acetato de sódio à 0,2M, juntamente com pérolas de vidro para incubação sob agitação por 2 horas a 45°C (New Braunwich, Scientific Company, New Jersey, EUA; Shaker incubator Series 25). Após esse procedimento, as preparações bacterianas foram centrifugadas a 10.000 g. a 4°C (Beckman, EUA; Centrifuge Model J2 MC) por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e dialisado por 15-18 horas. A dosagem proteica das diferentes OMC obtidas foi realizada segundo metodologia descrita por LOWRY et al., 1951. As amostras de OMCs foram alíquotadas e armazenadas em freezer à -20°C.

2h. Preparo da suspensão de células bacterianas íntegras de *N. meningitidis* ("whole-cells")

A partir do crescimento em ágar-chocolate base "*Müller-Hinton*" as cepas selecionadas B:4:P1.15 L3,7,9↑, B:4:P1.15 L3,7,9↓, B:4:P1.15 L8↑ e B:4:P1.15 L8↓ foram semeadas em placas de Petri com 15 cm de diâmetro descartáveis (Costar, Cambridge, MA, EUA), como descrito anteriormente. Após crescimento de aproximadamente 18 horas a 37°C, foi preparada uma suspensão bacteriana com o objetivo de se obter uma concentração correspondente a D.O.= 1,0 em comprimento de onda de 650 nm (CELM - modelo E2250) diluídas em PBS com 0,02% de azida sódica. Após crescimento, cada preparação bacteriana foi analisada pelo método de Gram para verificarmos o grau de pureza das preparações. As suspensões de células bacterianas íntegras foram agrupadas de acordo com a seleção, separadamente em tubos Falcon (Costar, Cambridge, MA, EUA) e acondicionadas em geladeira a 4°C.

2i. Obtenção de anticorpos policlonais anti- *N. meningitidis*

Para obtenção de anticorpos policlonais anti - OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9[↑], B:4:P1.15 L3,7,9[↓], B:4:P1.15 L8[↑] e B:4:P1.15 L8[↓] utilizamos camundongos da linhagem BALB/c. Empregou-se, para inoculação, a porta de entrada da bactéria: a via intranasal e também a via intramuscular. Nas preparações antigênicas de OMC a serem administradas pela via intramuscular, foi acrescentado hidróxido de alumínio (650 µg/mL; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Os grupos de animais imunizados pela via intranasal receberam os antígenos por instilação sem a presença de adjuvantes. O protocolo utilizado para imunização pela via intranasal foi de 4 doses de 20 µl (20µg por dose) com intervalos de 7 dias e o protocolo de imunização pela via intramuscular foi de 3 doses de 100µl (15 µg por dose) com intervalos de 30 dias. Os camundongos foram divididos em 8 grupos sendo que cada grupo era composto de 5 animais:

- **Grupo I:** Camundongos foram imunizados pela via intramuscular com 100 µl (15 µg por dose) de OMC da cepa L379[↑] com hidróxido de alumínio.
- **Grupo II:** Camundongos foram imunizados pela via intranasal com 20 µL (20 µg por dose) de OMC da cepa L379[↑].
- **Grupo III:** Camundongos foram imunizados pela via intramuscular com 100µl (15 µg por dose) de OMC da cepa L379[↓] com hidróxido de alumínio.
- **Grupo IV:** Camundongos foram imunizados pela via intranasal com 20 µL (20 µg por dose) de OMC da cepa L379[↓].
- **Grupo V:** Camundongos foram imunizados pela via intramuscular com 100 µl (15 µg por dose) de OMC da cepa L8[↓] com hidróxido de alumínio
- **Grupo VI:** Camundongos foram imunizados pela via intranasal com 20 µL (20 µg por dose) de OMC da cepa L8[↓].
- **Grupo VII:** Camundongos foram imunizados pela via intramuscular com 100 µl (15 µg por dose) de OMC da cepa L8[↑] com hidróxido de alumínio.

- **Grupo VIII:** Camundongos foram imunizados pela via intranasal com 20 μ L (20 μ g por dose) de OMC da cepa L8 $\uparrow$.

A tabela 1 demonstra as etapas dos esquemas de imunização utilizados em nossos estudos.

TABELA 1: Camundongos BALB/c imunizados com OMC de *N. meningitidis* B:4:P1.15 pelas vias intranasal ou intramuscular.

GRUPOS IMUNIZADOS	Nº DE CAMUNDONGOS UTILIZADOS	DOSE	Nº DE DOSES	INTERVALO DE DOSES	VIA DE IMUNIZAÇÃO UTILIZADA
Grupo 1 (L3,7,9 $\uparrow$)	5	15 μ g	3	30	Intramuscular
Grupo 2 (L3,7,9 $\uparrow$)	5	20 μ g	4	7	Intranasal
Grupo 3 (L3,7,9 $\downarrow$)	5	15 μ g	3	30	Intramuscular
Grupo 4 (L3,7,9 $\downarrow$)	5	20 μ g	4	7	Intranasal
Grupo 5 (L8 $\downarrow$)	5	15 μ g	3	30	Intramuscular
Grupo 6 (L8 $\downarrow$)	5	20 μ g	4	7	Intranasal
Grupo 7 (L8 $\uparrow$)	5	15 μ g	3	30	Intramuscular
Grupo 8 (L8 $\uparrow$)	5	20 μ g	4	7	Intranasal

*Os soros dos camundongos foram obtidos pelo plexo oftálmico em diferentes dias após a imunização, sendo que, posteriormente à coleta, foi feito um "pool" com os soros obtidos de animais dos respectivos grupos.

2j. Obtenção de saliva

A saliva foi obtida dos camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal ou intramuscular com OMC de *N. meningitidis* B, além da saliva de grupos de camundongos normais. Sete dias antes da obtenção da saliva, os camundongos receberam um "booster" com os respectivos antígenos (Tabela 1).

Para a coleta foi injetado primeiramente 100 μ L de pilocarpina (0,1 mg) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) por camundongo. A coleta da saliva foi realizada com pipeta automática e as amostras obtidas conservadas

no gelo. O inibidor de protease PMSF (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) foi acrescentado na concentração de 100 mg/mL do total de saliva obtida. Depois da coleta, as amostras de saliva foram conservadas em alíquotas no freezer -20°C.

2I. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os antígenos de *N. meningitidis* utilizados em nossos estudos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições redutoras, em sistema descontínuo seguindo-se o procedimento descrito por LAEMMLI et al., 1970. Este método foi utilizado para caracterizar a composição peptídica dos extratos utilizados em nossos estudos.

Preparo das Placas

Foram utilizadas placas de vidro com dimensões de 9,5x9,5cm, sobrepostas entre espaçadores de 1 mm de espessura colocadas nas extremidades laterais e inferior da placa. O gel de separação foi preparado a 13%. Adicionou-se o gel de separação até uma altura de 5,5 cm e acrescentou-se cerca de 1,5 cm de água bi-destilada gota a gota. Após aproximadamente 20 minutos, foi obtida a polimerização do gel. Em seguida, foi retirada a água por inversão da placa e adicionado o gel de empilhamento até o nível próximo do topo da placa. Foi inserido o pente que, logo após a polimerização, foi cuidadosamente retirado.

O tampão de corrida (Tris-hidroximetilaminometano 0,075 M, glicina 0,576 M e SDS 0,15, pH 8,3) foi adicionado e as amostras foram aplicadas. As corridas eletroforéticas foram feitas no aparelho da BioRad (model. 200/2.0, EUA), sendo a corrida iniciada a 50 V (cerca de 15 mA) até o empilhamento das amostras. Em seguida a voltagem foi aumentada e mantida a 100 V até o final da corrida eletroforética.

Preparo das Amostras

Em nossos estudos utilizamos células bacterianas íntegras com D.O. 1.0 ou OMC na concentração de 100 µg.

Métodos de coloração utilizados

“Coomassie Blue”

Para a caracterização proteica empregando-se a coloração por “Coomassie blue” as amostras foram preparadas utilizando 20 µL de células bacterianas íntegras ou OMC, 20 µL de tampão de amostra (62,5 mM de Tris-hydrochloride, pH 6,8, 1% (v/v) glicerol, 2% de água destilada e 0,5% de SDS a 10% (v/v) e 5 µL de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA)).

Após a corrida eletroforética o gel foi colocado em solução fixadora constituída de metanol a 50% e ácido acético a 10% durante 20 minutos à temperatura ambiente e corado por Coomassie Phast blue - R250 (Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, New Jersey, EUA) a 56°C por 1 hora. Em seguida, o gel foi descorado com várias trocas de ácido acético glacial a 7%.

Coloração pela Prata

As preparações antigênicas utilizadas na coloração da prata foram diluídas 1:10 em solução de 60 mM, Tris HCl, 1 mM EDTA e SDS à 2%, pH 6,8. Em seguida foi feita uma diluição 1:2 em solução de glicerol 37%, mercaptoetanol 7,4% e solução saturada de azul de bromofenol 0,9%.

Aplicamos juntamente com as amostras um padrão de proteínas com peso molecular conhecido (Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, New Jersey, EUA). Os padrões de peso molecular usados foram: fosforilase b (94kDa); albumina bovina (67 kDa); ovalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (30,1 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa) e alfa-lactoalbumina (14,4 kDa). Os pesos moleculares (P.M.) das bandas foram determinados a partir da reação linear

entre o log do P.M. e migração relativa (R.F.) de proteínas-padrão. Depois de preparadas, as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100°C.

A coloração do gel com nitrato de prata foi feita de acordo com TSAI & FRASCH, 1982, com algumas modificações. O gel foi fixado durante 18 horas em solução contendo etanol à 40%, ácido acético a 5% e ácido periódico a 0,031 M). Posteriormente, o gel foi lavado com água bi-destilada e foi acrescentada solução oxidante para incubação durante 15 minutos e, em seguida, lavado mais três vezes durante 15 minutos em água bi-destilada. Para preparar esta solução, adicionou-se 5 mL de nitrato de prata a 20% (gota a gota) a uma solução contendo 2 mL de hidróxido de amônio a 25% e 14 mL de hidróxido de sódio a 0,1 N sob agitação e, em seguida, foram acrescentadas 132 mL de água bi-destilada. Foram feitas mais duas lavagens de 10 minutos em água bi-destilada e as bandas foram reveladas com solução redutora (ácido nítrico a 0,065 mM e 0,25 mL de formaldeído a 37% a um volume final de 500 mL). Após a coloração, o gel foi lavado duas vezes durante 10 minutos em água bi-destilada. Todo o protocolo técnico foi feito sob agitação (exceto a fixação do gel) e à temperatura ambiente de 20°C.

2m. "Immunoblotting"

Para realização do ensaio de "Immunoblotting", após a eletroforese, o gel foi retirado cuidadosamente das placas e incubado em tampão de transferência (Tris-hidroximetilaminometano 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%, pH 8,3) por 20 minutos. Foi feito um sanduíche com 3 folhas de papel de filtro (2 folhas de papel de filtro nº2 e uma folha de papel de filtro nº 1 (Watman, nº 1, EUA)), a membrana de nitrocelulose, o gel e mais uma seqüência 3 folhas de papel de filtro, todas previamente embebidas em tampão de transferência. Os peptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos do gel, para membrana de nitrocelulose, segundo metodologia descrita por TOWBIN *et al.*, 1979. A transferência foi realizada por um período de 18 horas a 50 mA e voltagem

constante de 17 V. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau-S a 0,5% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) para controle da transferência. Após secagem, as membranas foram envolvidas em papel de filtro, vedadas em saco plástico e armazenadas a 4°C, até o momento do uso, e foram utilizadas no máximo até uma semana após realizada a transferência eletroforética.

Depois da transferência, as membranas de nitrocelulose foram lavadas sob agitação constante com PBS pH 7,4 para então efetuar-se o bloqueio dos sítios ativos com leite desnatado 5% (Molico, Nestlé do Brasil) diluído em PBS por 2 horas. Foram feitas novas lavagens com PBS após o bloqueio e, em seguida, a incubação de 15-18 horas com as amostras de soro normal e anti-soros obtidos de animais dos grupos I a VIII, sendo que os soros dos animais imunizados pela via intranasal foram diluídos a 1:50 e os soros de camundongos imunizados pela via intramuscular foram diluídos a 1:100 em solução contendo leite desnatado (Molico, Nestlé do Brasil) a 2,5%. No dia seguinte as membranas foram lavadas mais cinco vezes com PBS pH 7,4, adicionou-se conjugado específico anti-imunoglobulina de camundongo conjugado à peroxidase diluído a 1:2000 (anti IgM, IgG ou IgA; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) e incubadas por um período de mais de 2 horas. Após sucessivas lavagens foi adicionado o substrato AEC (Pierce) 2,6 mL AEC à 4% + 40 mL de solução de acetato de sódio, pH 5,0 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA)). A reação enzimática foi interrompida com água bi-destilada.

Utilizamos em nossos estudos para reação com anticorpos monoclonais contra classe 1, classe 2, classe 4 e classe 5, proteína de 50kDa e LPS de membrana externa de *N. meningitidis* e os seguintes substratos: 2,5 mg de 3,3 Diaminobenzidina - DAB (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, EUA) e AEC (Immuno pure - AEC – Pierce). Esses monoclonais foram revelados individualmente com cada substrato após prévia padronização do tempo de incubação em uma mesma fita.

2n. ELISA

O procedimento utilizado foi baseado na técnica de ABDILLAH I & POOLMAN, 1988, com algumas modificações. Placas de microtitulação de fundo chato (Polysorb – Costar, Cambridge, MA, EUA) foram sensibilizadas com 100 µL da suspensão de bactérias mortas com azida sódica a 0,02% (suspensão de células bacterianas íntegras) das cepas de *N. meningitidis* selecionadas para LPS numa concentração de D.O. = 1,0 à 650 nm, 18 horas a 37°C. Depois da incubação, foi feita a lavagem com PBS/Tween a 0,05% e, a seguir, os sítios ativos das placas foram bloqueados com 200 µL por cavidade com leite desnatado a 5% (Molico Nestlé do Brasil) a 37°C por 2 horas. As placas foram novamente lavadas cinco vezes por 5 minutos com PBS/Tween a 0,05%. As amostras de soros de camundongos foram diluídas na razão 2, a partir de 1:100 para animais inoculados pela via intranasal e 1:200 para a via intramuscular e adicionado num volume de 100 µL por cavidade e incubadas à 37°C por duas horas. Em seguida, mais uma lavagem foi feita com PBS/Tween a 0,05% e, posteriormente, foram adicionados 100 µL por cavidade de anticorpos anti - IgM, IgG ou IgA marcados com peroxidase diluídos a 1:2.000, previamente padronizados pela titulação em bloco. As placas foram incubadas com esses conjugados a 37°C por 2 horas e, posteriormente, lavadas e reveladas com 100 µL por cavidade de solução cromógena contendo 250 µL de TMB, 12,5 mL de citrato +2,5 mL de H₂O₂ (30%) por um período de 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 100 µL de solução de H₂SO₄, 1 N.

2o. Atividade Bactericida

- **Fonte de complemento:** Para a quantificação dos anticorpos nos soros de camundongos, utilizou-se como fonte de complemento um “pool” de soros de coelhos de 3 a 4 semanas de idade (“baby rabbit”). Os soros foram absorvidos

com um inóculo bacteriano (10^9 ufc/mL) da cepa homóloga de *N. meningitidis*. A massa bacteriana foi sedimentada por meio de centrifugação a 10.000 g. por 10 minutos. Uma parte dos soros foi inativada a 56°C por 30 minutos para ser utilizada como controle.

- **Teste Bactericida:** O ensaio foi realizado conforme descrito por MASLANKA et al, 1977, com algumas modificações. A reação final (50 μ L) consistiu de diferentes diluições (25 μ L) do soro teste inativado a 56°C por 30 minutos, 25% (12,5 μ L) de complemento e 12,5 μ L da suspensão bacteriana (cerca de 3×10^3 ufc/mL) obtida na fase log de crescimento em ágar soro. Após a incubação a 37°C por 30 minutos adicionou-se TSB (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) mais o ágar 1.5%, (Difco® Laboratories, Detroit, MI, EUA), contendo uma mistura de antibióticos (VCN, Difco, Laboratories, Detroit, MI, EUA) às microplacas com 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, EUA). Culturas quantitativas foram realizadas nos tempos zero e após 30 minutos da reação. Seguiu-se a incubação a 37°C /5% de CO₂ por aproximadamente 18 horas. O título bactericida foi definido como a recíproca da maior diluição do soro teste resultando em pelo menos 50% de morte bacteriana.

O controle positivo consistiu de um soro hiperimune com títulos previamente determinados, gentilmente cedidos pela Dra. Cecília O. Gorla, da Seção de Bacteriologia IAL.

A morte bacteriana independentemente de complemento foi controlada pela reação do soro teste inativado, complemento inativado e bactérias nas condições descritas acima.

III- Resultados

Os experimentos relatados a seguir foram realizados com soros e saliva de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal ou intramuscular com antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* B, objetivando-se a análise das diferentes vias de imunização.

3a. Caracterização imunoquímica das preparações antigênicas utilizadas:

Em nossos estudos utilizamos a cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9,8 que foi sorotipada na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz com anticorpos monoclonais para sorogrupos, sorotipos e imunotipos de nossa coleção, gentilmente cedidos pelo Dr. Wendell Zollinger e Jan Poolman (RIVM, Vaccine, Holanda). A cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8 foi primeiramente caracterizada imunoquimicamente por meio da separação proteica em gel SDS-PAGE 13% e coloração por Coomassie e prata para verificarmos o perfil eletroforético das proteínas e do LPS.

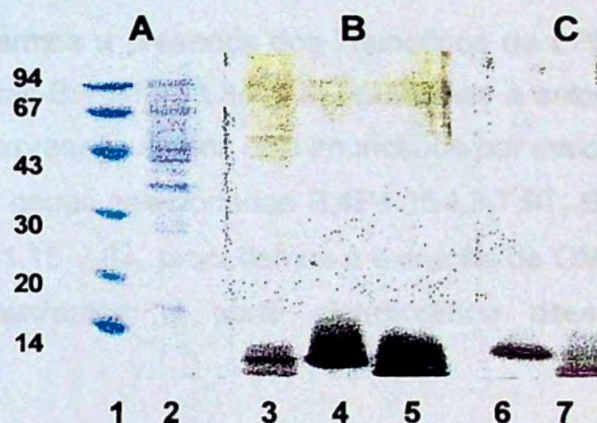


Figura 1: Perfil de peptídeos de suspensão de células bacterianas integras ("whole-cells") e OMC após eletroforese em gel de poliacrilamida (13%) e coloração por Coomassie blue de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15. A-(1) Peso molecular; A-(2) OMC da cepa B:4:P1.15 após coloração por Coomassie Blue; B-(3) OMC da cepa B:4:P1.15 após coloração pela prata; B-(4) perfil de L379 purificado de *N. meningitidis* após coloração pela prata; B-(5) perfil de L8 purificado de *N. meningitidis* após coloração pela prata; C-(6) Reatividade do anticorpo monoclonal anti-L379; C-(7) Reatividade do anticorpo monoclonal anti-L8.

A figura 1 mostra o perfil eletroforético de peptídeos de cepas de *N. meningitidis* coradas pelo Coomassie blue (A-2) e nitrato de prata (B-3, B-4 e B-5) antes da seleção por anticorpos monoclonais. A figura 1(B-3) apresenta o padrão de LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8 da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9,8 e na figura 1(B-4, e B-5) observamos o perfil eletroforético dos LPS purificados L3,7,9 (4,5 kDa) e L8 (3,6 kDa). Na figura 1 observamos também a reatividade dos LPS L3,7,9 (figura 1C-6) e L8 (figura 1C-7) da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9,8 com os respectivos anticorpos monoclonais anti-L3,7,9 (4BE12-C10-L3,7,9) e anti-L8 (6E7-10-L8).

RESULTADOS

Após caracterizarmos a presença dos imunotipos de LPS L3,7,9 e L8 na cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9,8, realizamos a seleção das colônias com maior e menor expressão destes dois imunotipos por meio de "colony-blot". Com a obtenção das cepas selecionadas B:4P1.15 L3,7,9 $\uparrow$, B:4P1.15 L3,7,9 $\downarrow$, B:4P1.15 L8 $\uparrow$ e B:4P1.15 L8 $\downarrow$, procedemos à extração de OMCs de cada uma das cepas e comparamos o perfil eletroforético dessas preparações antigênicas.

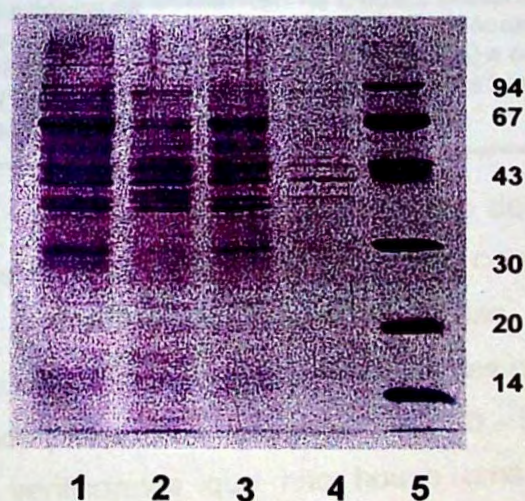


Figura 2: Perfil de peptídeos de suspensão de células bacterianas íntegras ("whole-cells") e OMC das de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas com anticorpos monoclonais. Eletroforese em gel de poliacrilamida (13%) e coloração por Coomassie Blue: (1) B:4:P1.15 L3,7,9 $\uparrow$ w.c.; (2) B:4:P1.15 L3,7,9 $\uparrow$ OMC; (3) B:4:P1.15 L3,7,9 $\downarrow$ w.c.; (4) B:4:P1.15 L3,7,9 $\downarrow$ OMC; (5) Padrão de Peso Molecular.

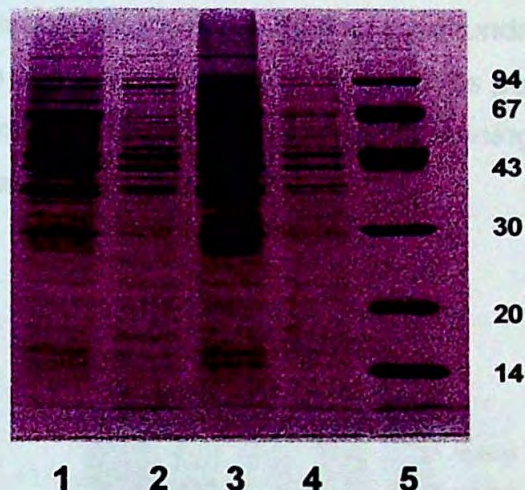


Figura 3: Perfil de peptídeos de suspensão de células bacterianas íntegras ("whole-cells") e OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas com anticorpos monoclonais. Eletroforese em gel de poliacrilamida (13%) e coloração por "Coomassie Blue": (1) B:4:P1.15 L8↑ w.c.; (2) B:4:P1.15 L8↑ OMC; (3) B:4:P1.15 L8↓ w.c., (4) B:4:P1.15 L8↓ OMC; (5) Padrão de Peso Molecular.

As figuras 2 e 3 mostram o perfil eletroforético de suspensão de células bacterianas íntegras ("whole-cells") e OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 L3,7,9↑, L3,7,9↓, L8↑, L8↓ selecionadas por "colony-blot" com anticorpos monoclonais anti- L3,7,9 e L8. As diferentes preparações antigênicas apresentam antígenos predominantes na faixa de 30 - 90 kDa. A análise entre as cepas permitiu verificarmos que não houve uma diferença significativa quando comparamos o padrão de peptídeos apresentado pelas suspensões de células bacterianas íntegras e OMCs das cepas analisadas. Observamos um aumento da intensidade de coloração para os peptídeos de 70 kDa, classe 1 (46 kDa), classe 3 (38 kDa), classe 4 (33 kDa) e classe 5 (28 kDa). Independentemente da seleção para L3,7,9 ou L8, não observamos diferenças significativas quanto ao padrão de peptídeos após a coloração por "Coomassie Blue".

Como nas epidemias de meningite meningocócica estão envolvidos meningococos de diversos sorotipos e subtipos, é de fundamental importância a análise da reatividade cruzada por anticorpos induzidos pela preparação vacinal em estudo. Nesse sentido utilizamos cepas de *N. meningitidis* prevalentes em epidemias ocorridas no Brasil.

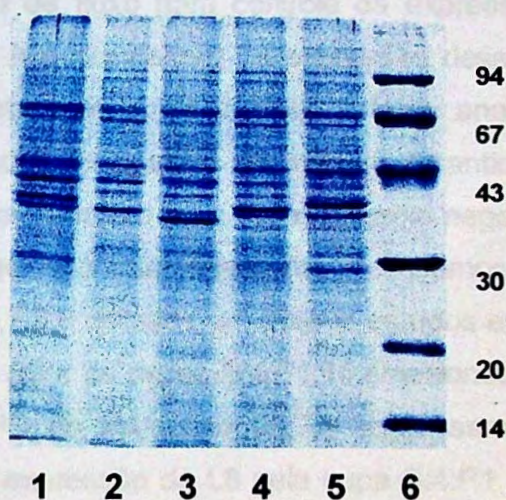


Figura 4: Perfil de peptídeos de suspensão de células bacterianas integras ("whole-cells") de cepas de *N. meningitidis* após eletroforese em gel de poliacrilamida (13%) e coloração por "Coomassie Blue": (1) w.c. B:4:P1.15 L3,7,9,8; (2) w.c. B:4.P1.9; (3) w.c. B:14:NT; (4) w.c. C:2a:P1.2; (5) w.c. B:4:NT; (6) Peso molecular.

A figura 4 mostra o perfil eletroforético de diferentes cepas de *N. meningitidis* utilizadas nos estudos de reatividade cruzada por meio de ELISA e "Immunoblotting". Podemos observar por meio da coloração por "Comassie Blue" a predominância de peptídeos na faixa entre 30 e 94 kDa, mostrando um perfil homogêneo das cepas utilizadas em nossos estudos.

3b. CITOMETRIA DE FLUXO

Como descrito em Materiais e Métodos selecionamos por “*colony-blot*”, colônias que apresentaram maior ou menor reatividade com os anticorpos monoclonais 4BE12-C10 (anti-L3,7,9) e 6E7-10 (anti-L8), isto é, foi feita uma seleção de colônias da cepa B:4:P1.15 L3,7,9 L8 com maior (↑) ou menor (↓) expressão dos imunotipos L3,7,9 e L8. Após a seleção, as cepas foram analisadas por citometria de fluxo para controle da expressão dos LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8. A porcentagem de expressão desses imunotipos na membrana externa bacteriana de *N. meningitidis* pode ser analisada na figura 5.

Utilizamos como controle positivo da reação o anticorpo monoclonal 8C7Br1 (anti- 50 kDa) mostrado em (a) e como controle negativo um anticorpo monoclonal do isótipo IgG não relacionado (b). Verificamos pelos resultados que a cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8 utilizada em nossos estudos expressou 9,7% de LPS do imunotipo L3,7,9 (c) e as cepas B:4:P1.15 selecionadas para maior ou menor expressão de LPS do imunotipo L3,7,9 expressam respectivamente 29,1% (d) e 1,3% (e). A expressão de L8 pela cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8 foi de 6,5% (f), enquanto na cepa B:4:P1.15 selecionada para maior expressão de L8 foi de 14,8% (g) e na cepa de menor expressão foi de 0,72% (h).

RESULTADOS

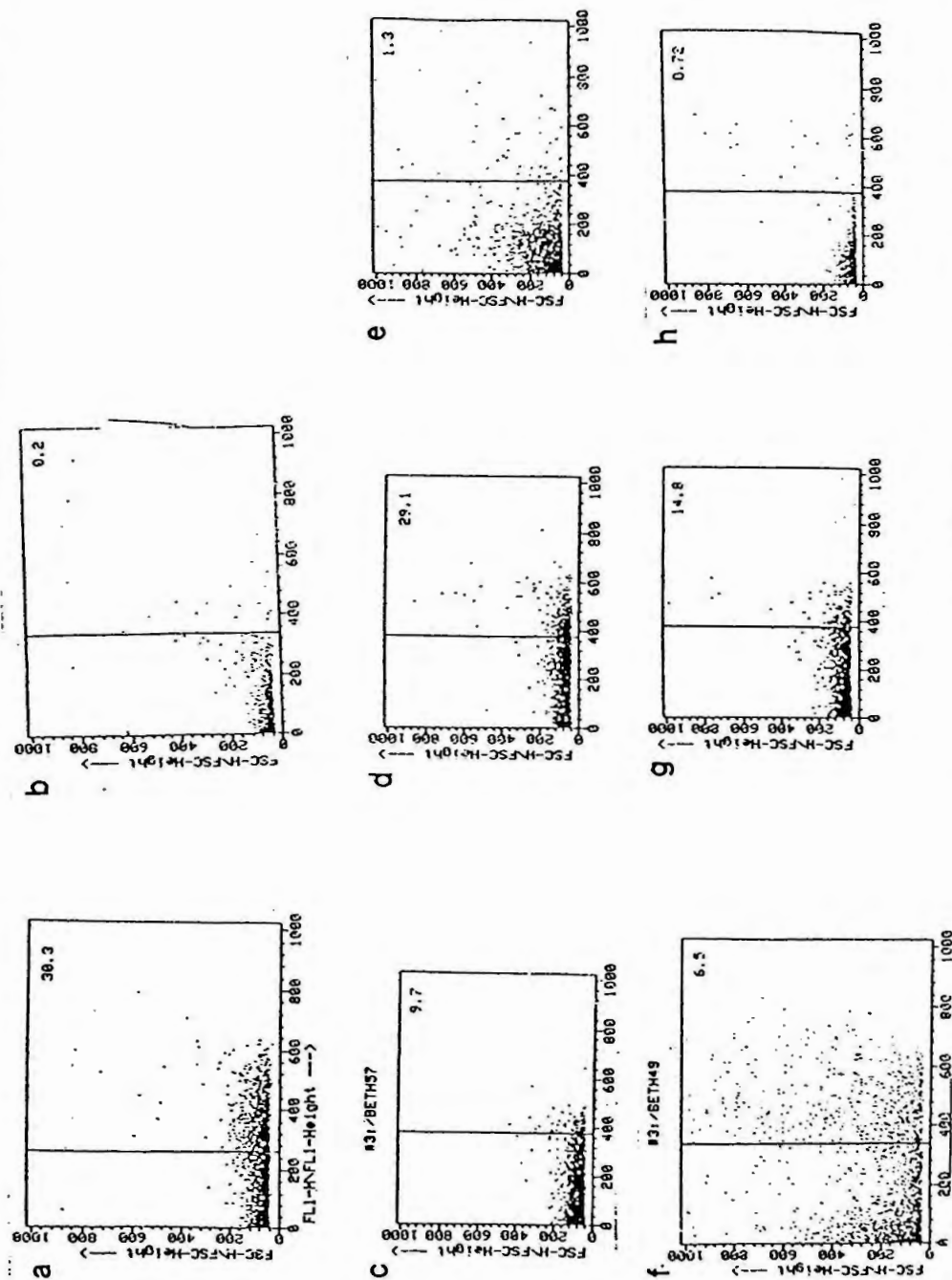


Figura 6: Citometria de Fluxo ("Dot plots") com suspensão de células bacterianas íntegras ("whole-cells") de *N. meningitidis*. Reactividade contra antígenos presentes na superfície de membrana externa com anticorpos monoclonais: (a) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 8C7Br1 (anti-proteína de 50 kDa) diluído a 1:500; (b) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal do isótipo IgG não relacionado; (c) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 4BE12-C10 (anti-LPS L3,7,9,8) diluído a 1:1000; (d) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 4BE12-C10 diluído a 1:1000; (e) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 4BE12-C10 diluído a 1:1000; (f) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 6E7-10 (anti-LPS L8) diluído a 1:1000; (g) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 6E7-10 diluído a 1:1000; (h) cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, anticorpo monoclonal 6E7-10 diluído a 1:1000.

3.c ELISA:

Por ELISA pudemos analisar:

- anticorpos dos isótipos M, G e A no 30º e 60º dia após imunização pela via intramuscular;
- anticorpos dos isótipos M, G e A no 35º dia após a imunização pela via intranasal;
- reatividade de anticorpos dos isótipos IgG e IgA para cepas heterólogas de *N. meningitidis* presentes em pools de soros de camundongos imunizados pela via intranasal;
- reatividade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes em pools de salivas de camundongos imunizados pela via intranasal;
- presença nos pools de soros de anticorpos dos isótipos M, G e A quatro meses e um ano após imunização pela via intranasal.

Para esse ensaio preparações de células bacterianas íntegras de *N. meningitidis* foram utilizadas na sensibilização das placas de ELISA.

3.c.1 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM, IgG E IgA PRESENTES NOS POOLS DE SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/c OBTIDOS NO 30º E 60º DIA APÓS IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRAMUSCULAR COM OMC DE CEPAS HOMÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS (L3,7,9↑, L3,7,9↓, L8↑ E L8↓).

Os anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA produzidos pelos camundongos imunizados pela via intramuscular foram quantificados utilizando-se como antígeno suspensões de células bacterianas íntegras de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 com as diferentes seleções de imunotipo de LPS (L3,7,9↑, L3,7,9↓, L8↑ e L8↓). As amostras de soros utilizadas foram obtidas no 30º e 60º dia após imunização.

RESULTADOS

As figuras 6, 7 e 8 apresentam a quantidade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intramuscular. Não pudemos detectar a presença dos anticorpos dos isótipos IgM (figura 6) e IgA (figura 8) no soro dos camundongos, entretanto anticorpos do isótipo IgG (figura 7) puderam ser detectados já a partir do 30º dia após a imunização. Um significativo aumento nos títulos desses anticorpos puderam ser detectados após o "booster" (no 60º dia após imunização, figura 7). Não observamos diferenças significativas no título de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC para as diferentes seleções do imunotipo de LPS de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

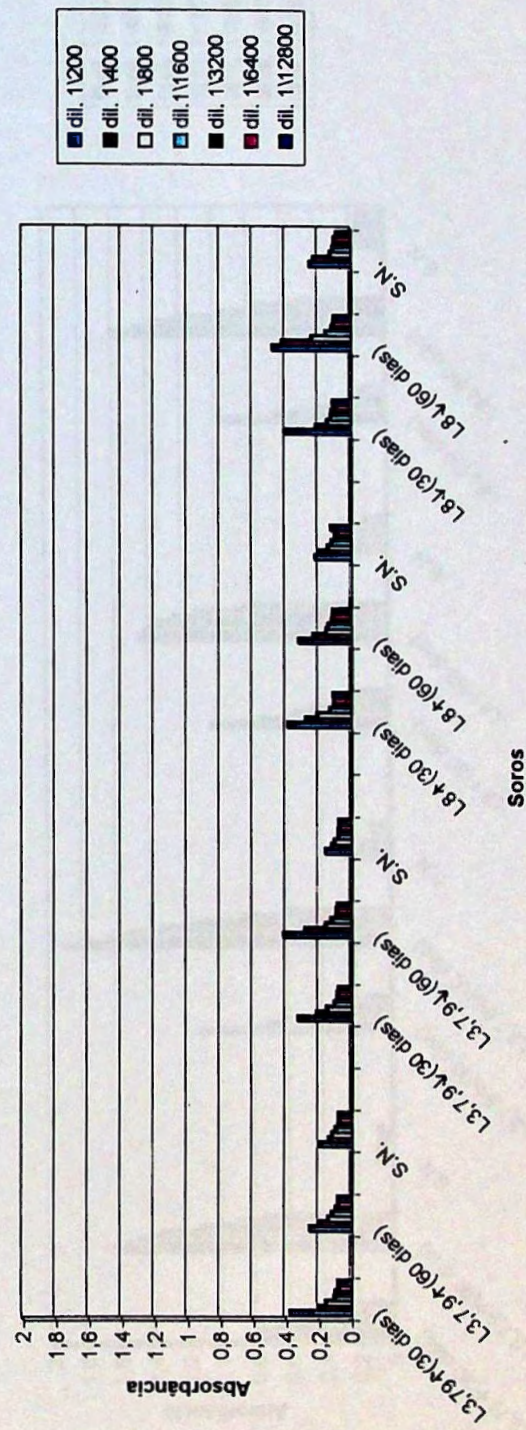


Figura 6: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgM para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

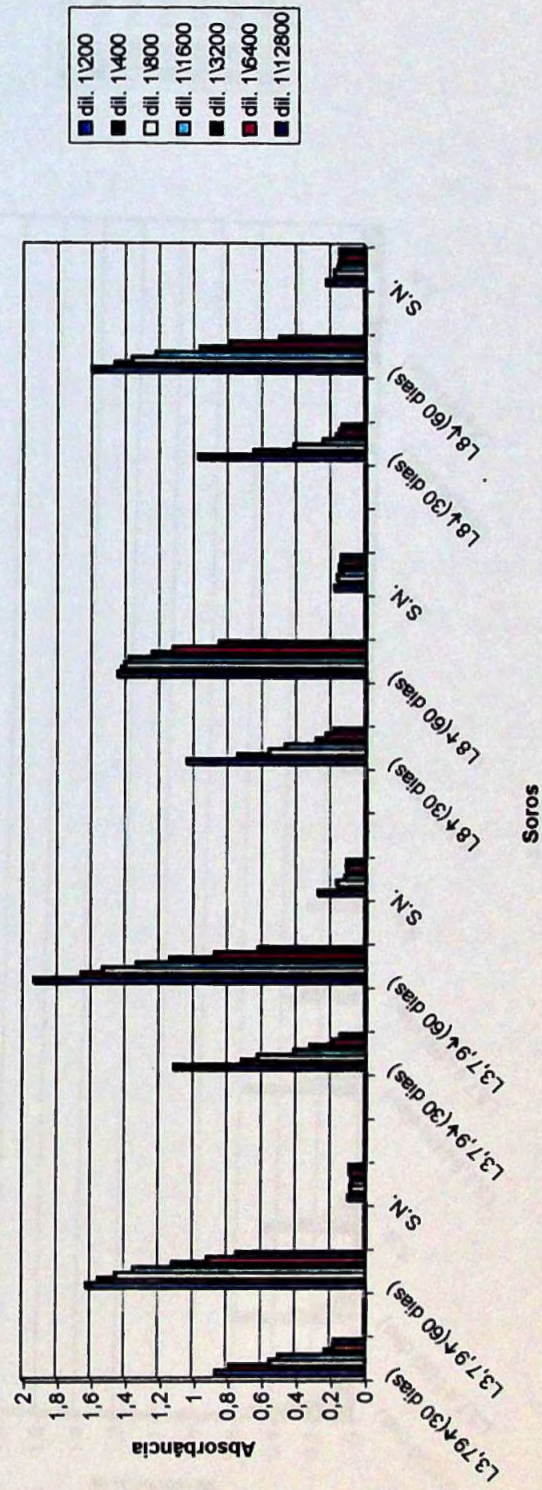


Figura 7: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgG para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

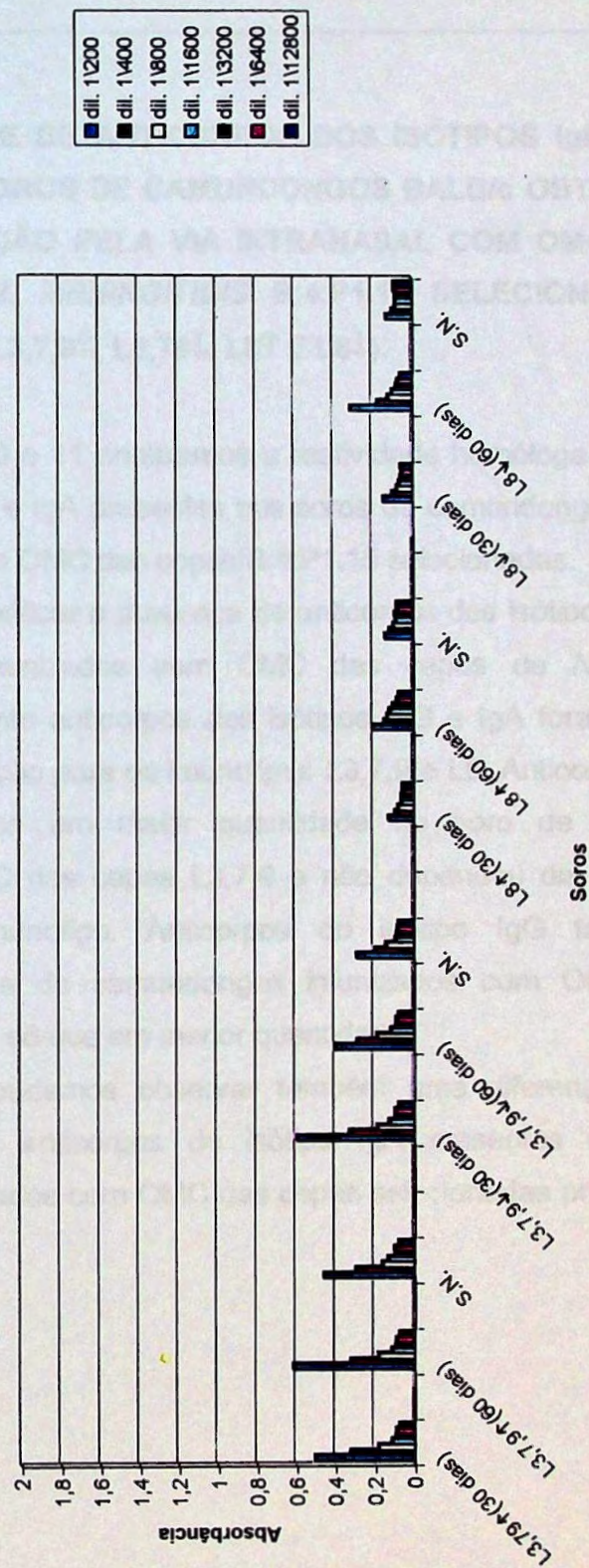


Figura 8: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgA para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

3.c.2 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM, IgG E IgA PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/c OBTIDOS NO 35^o DIA APÓS IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRANASAL COM OMC DE CEPAS HOMÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS (L3,7,9↑, L3,79↓, L8↑ E L8↓).

Nas figuras 9, 10 e 11 analisamos a reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas.

Não pudemos verificar a presença de anticorpos dos isótipos IgM no soro de camundongos imunizados com OMC das cepas de *N. meningitidis* selecionadas, entretanto anticorpos dos isótipos IgG e IgA foram detectados, independente da seleção para os imunotipos L3,7,9 e L8. Anticorpos do isótipo IgG foram detectados em maior quantidade no soro de camundongos imunizados com OMC das cepas L3,7,9 e não dependeu da quantidade de expressão desse imunotipo. Anticorpos do isótipo IgG também foram detectados nos soros de camundongos imunizados com OMC de cepas selecionadas para L8 só que em menor quantidade.

Nesse estudo pudemos observar também uma diferença significativa quanto ao nível de anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas para o imunotipo L3,7,9.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 35º dia após imunização pela via intranasal com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

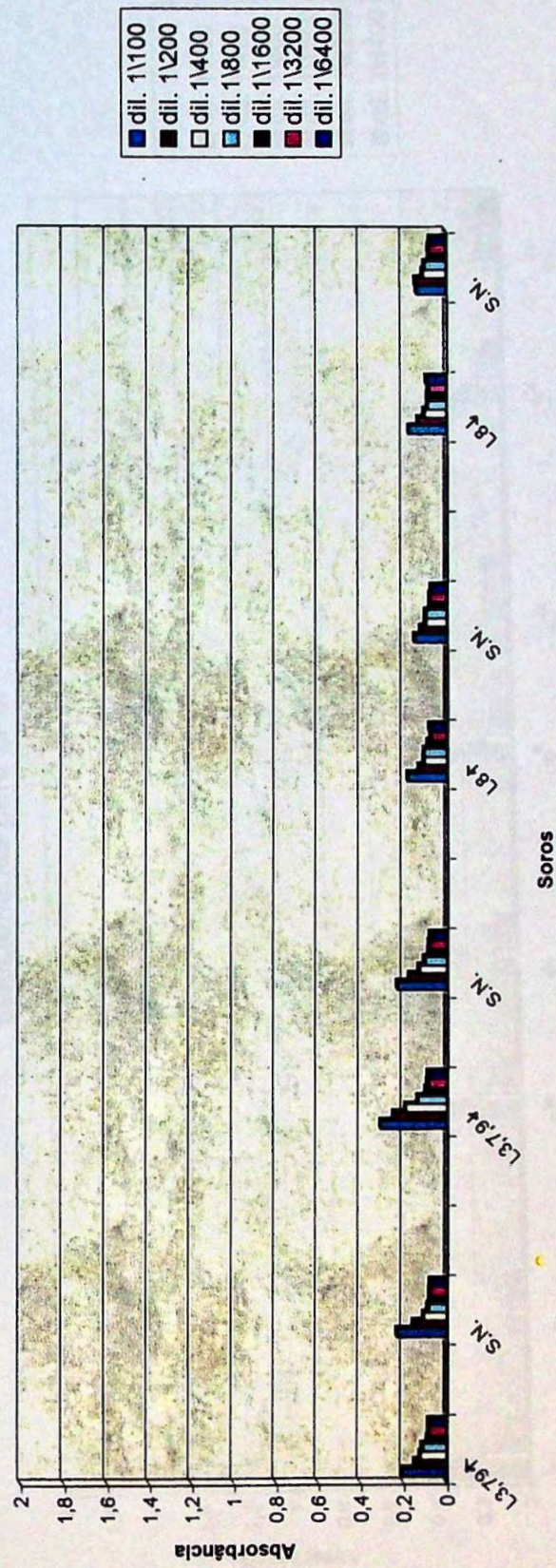


Figura 9: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgM para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 35º dia após imunização pela via intranasal com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

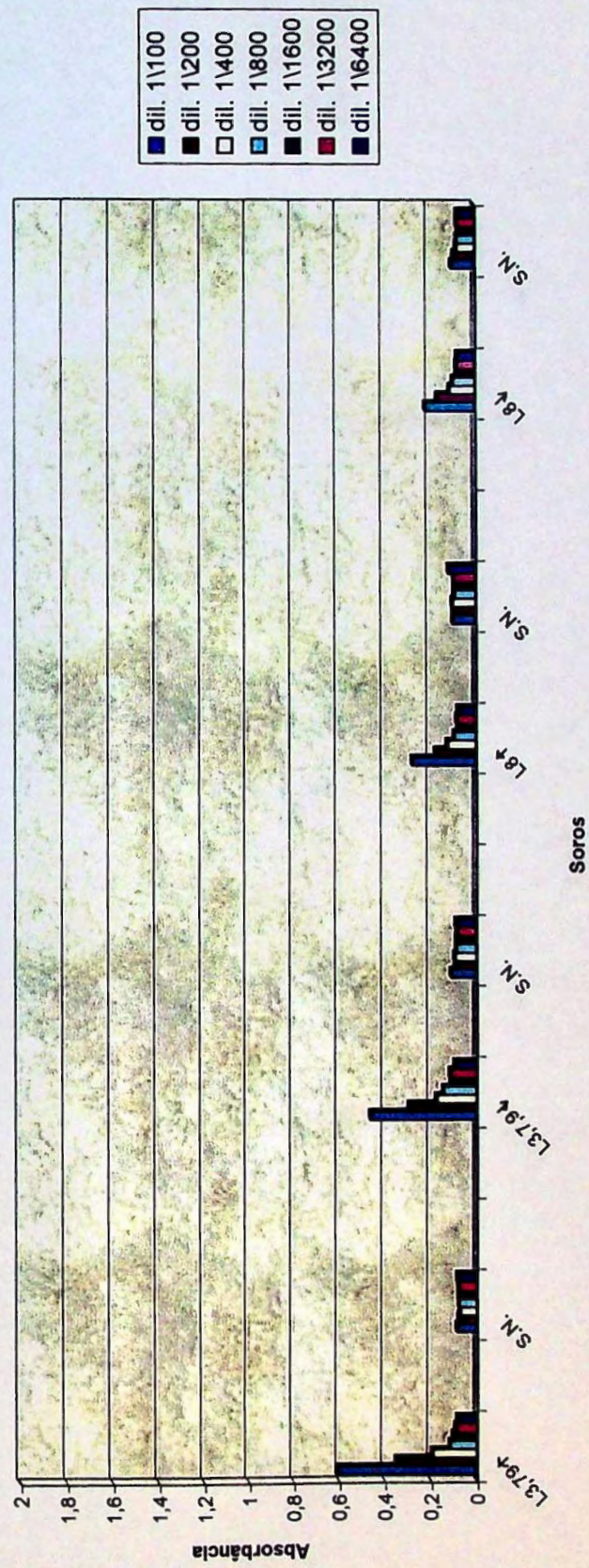


Figura 10: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgG para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos no 35º dia após imunização pela via intranasal com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

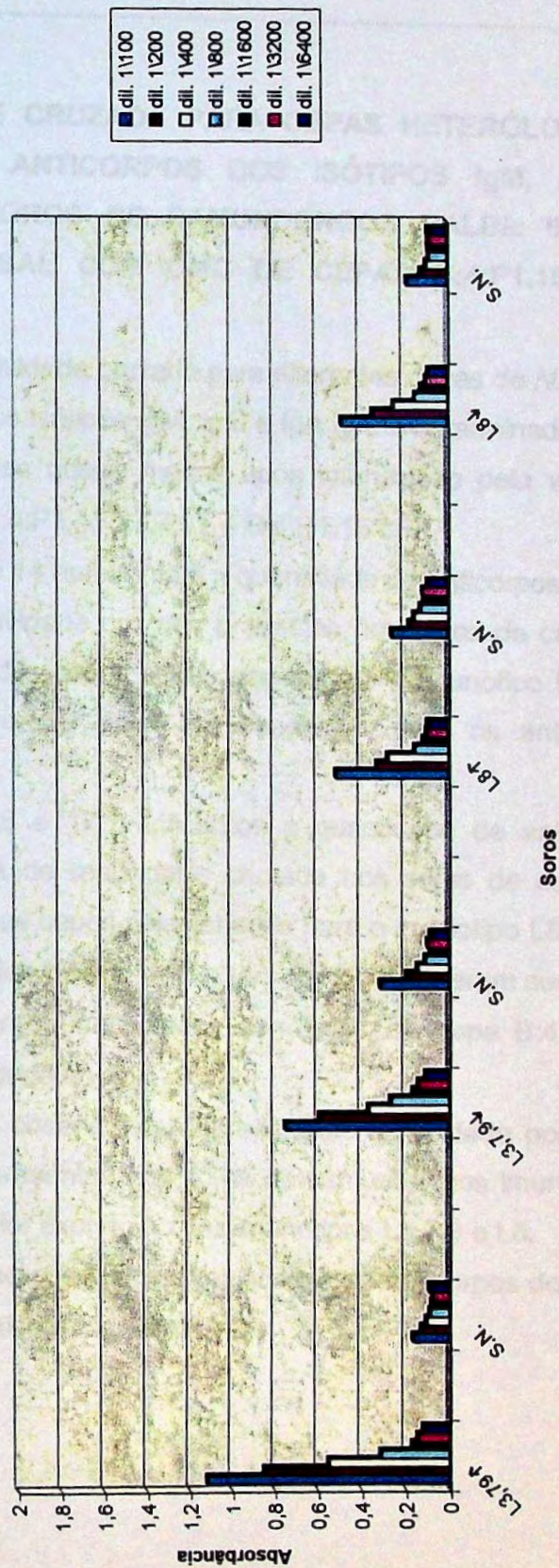


Figura 11: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgA para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

3c.3 REATIVIDADE CRUZADA PARA CEPAS HETERÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* POR ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM, IgG E IgA, PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL COM OMC DE CEPAS B:4:P1.15 L3,7,9 $\uparrow$ E B:4:P1.15 L8 $\uparrow$.

No estudo da reatividade cruzada para diferentes cepas de *N. meningitidis*, o nível de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA foram determinados nos soros de camundongos obtidos quatro meses após imunização pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9 $\uparrow$ e B:4:P1.15 L8 $\uparrow$.

As figuras 12, 13 e 14 apresentam a quantidade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA de reatividade cruzada presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas para o imunotipo L3,7,9, onde uma reatividade preferencial pode ser observada para os anticorpos dos isótipos IgG e IgA.

Nas figuras 15, 16 e 17, verificamos a quantidade de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA de reatividade cruzada nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas para o imunotipo L8. Anticorpos de reatividade cruzada dos isótipos IgG e IgA também puderam ser detectados nos soros de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 L8 $\uparrow$, porém em menor quantidade do que L3,7,9.

Nessa análise não observamos diferenças de reatividade por anticorpos dos isótipos IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas com maior expressão dos imunotipos L3,7,9 e L8.

Como esperado, não observamos reatividade de anticorpos do isótipo IgM para as cepas de *N. meningitidis* utilizadas.

Reatividade para diferentes cepas de *N. meningitidis* dos anticorpos do isótipo IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa B:4:P1.15 L3,7,9↑

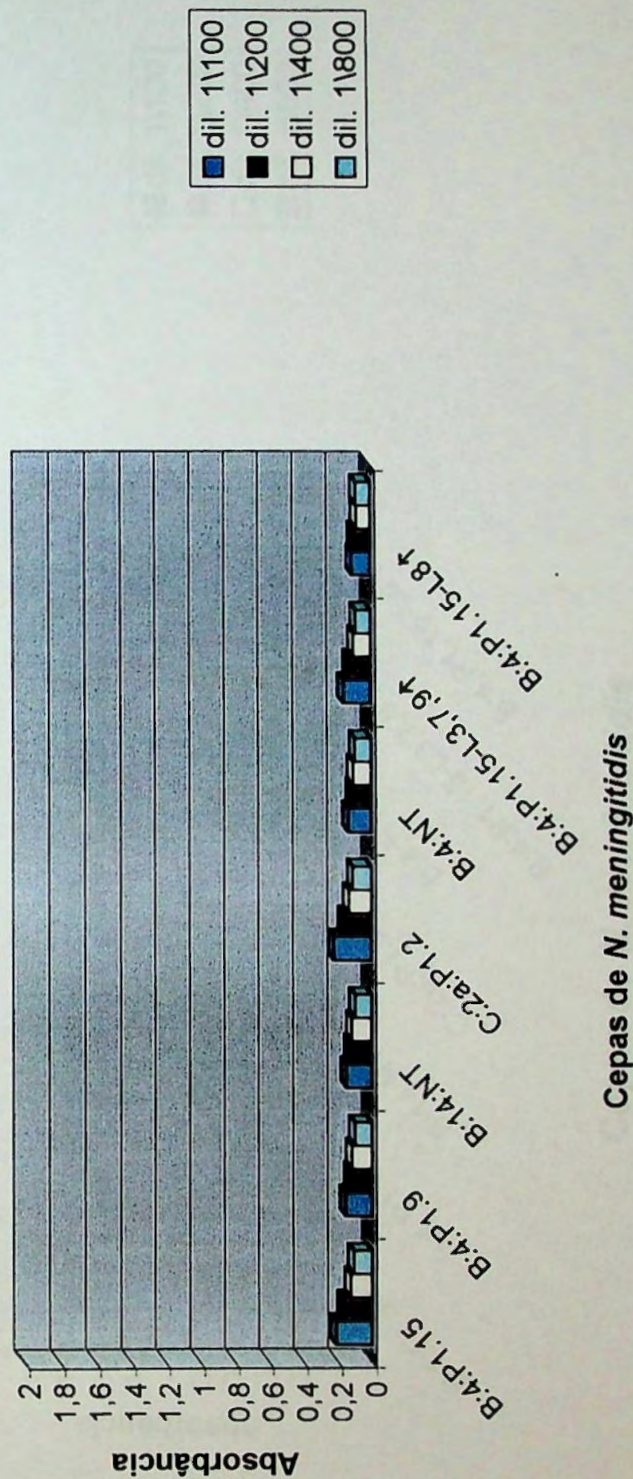
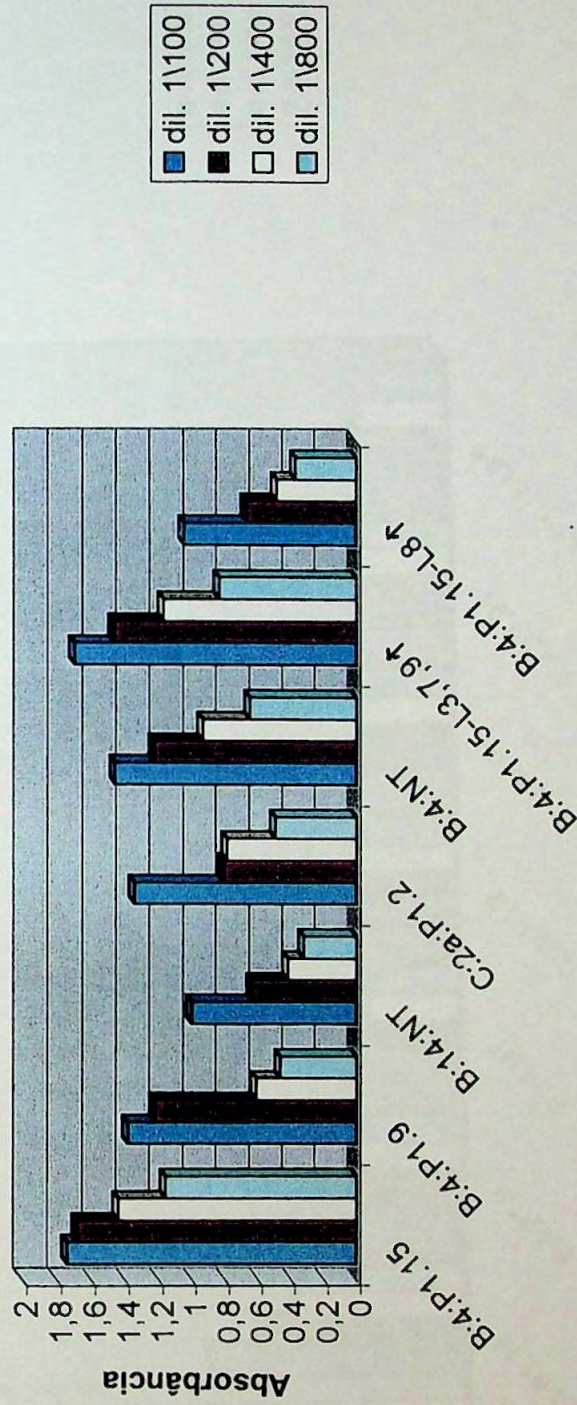


Figura 12: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgM para "whole-cells" de cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade para diferentes cepas de *N. meningitidis* de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC da cepa B:4:P1.15 L3,7,9↑



Cepas de *N. meningitidis*

Figura 13: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgG para "whole-cells" de cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade para diferentes cepas de *N. meningitidis* dos anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC da cepa B:4:P1.15 L3,7,9 ↑

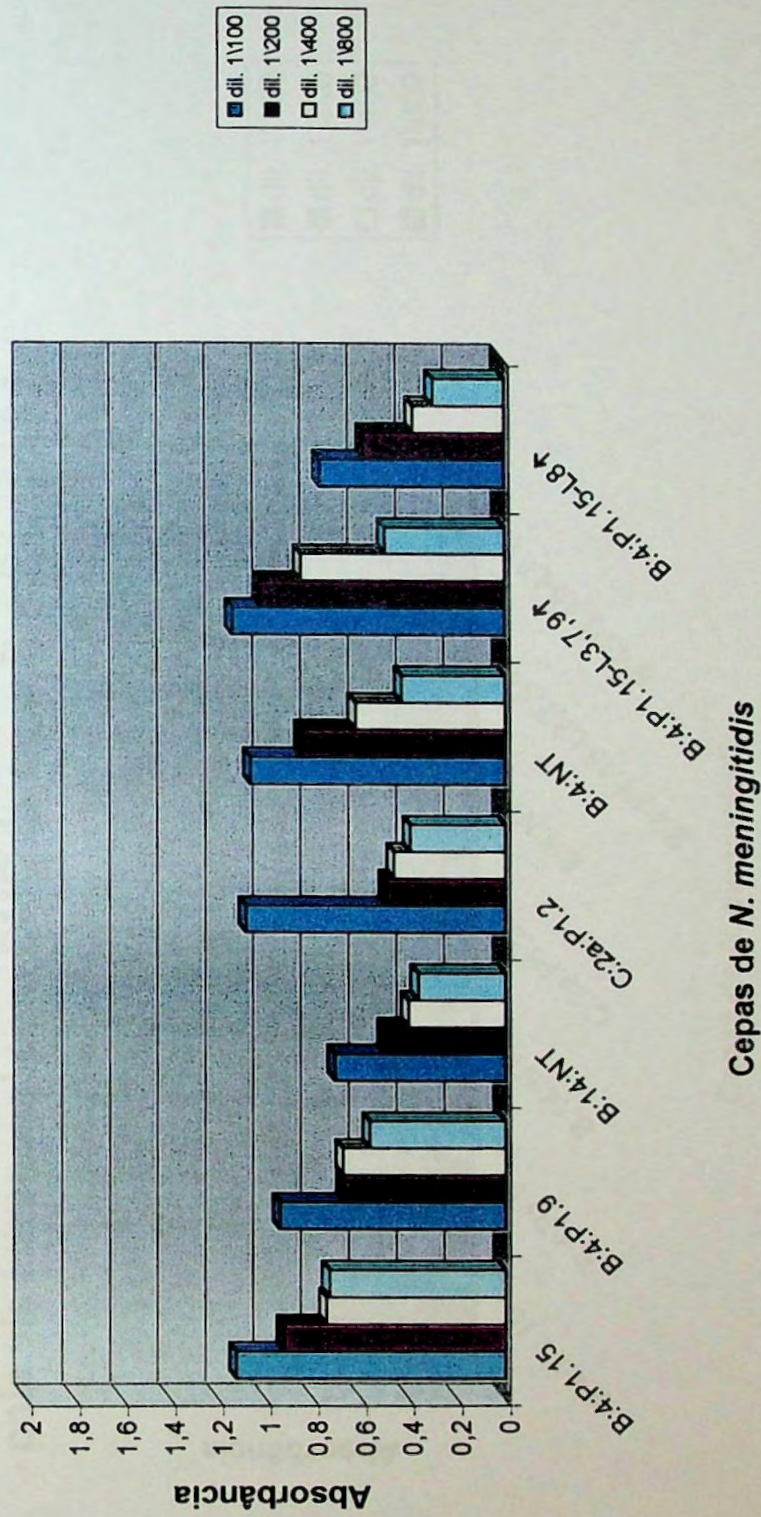


Figura 14: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgA para "whole-cells" de cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade para diferentes cepas de *N. meningitidis* dos anticorpos do isótipo IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa B:4:P1.15 L8↑

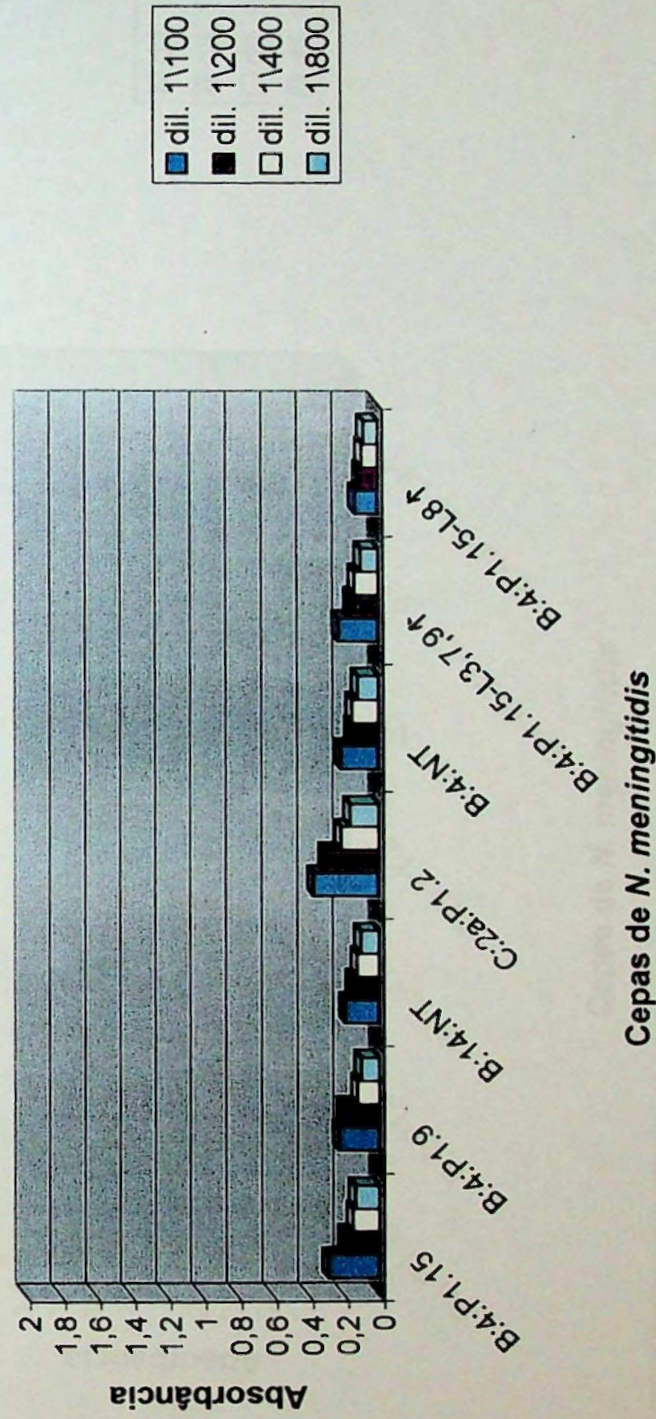


Figura 15: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgM para "whole-cells" de cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade para diferentes cepas de *N. meningitidis* dos anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa B:4:P1.15 L8↑

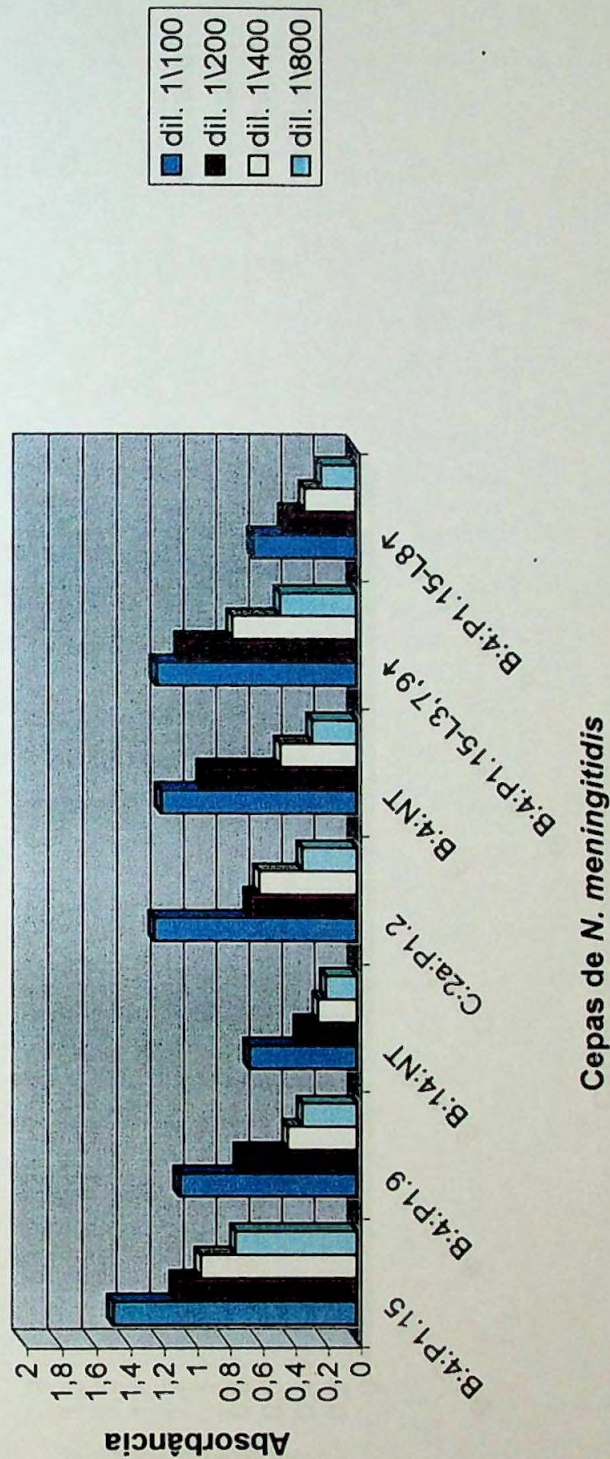


Figura 16: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgG para "whole-cells" de cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade para diferentes cepas de *N. meningitidis* dos anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC da cepa B:4:P1.15 L8 ↑

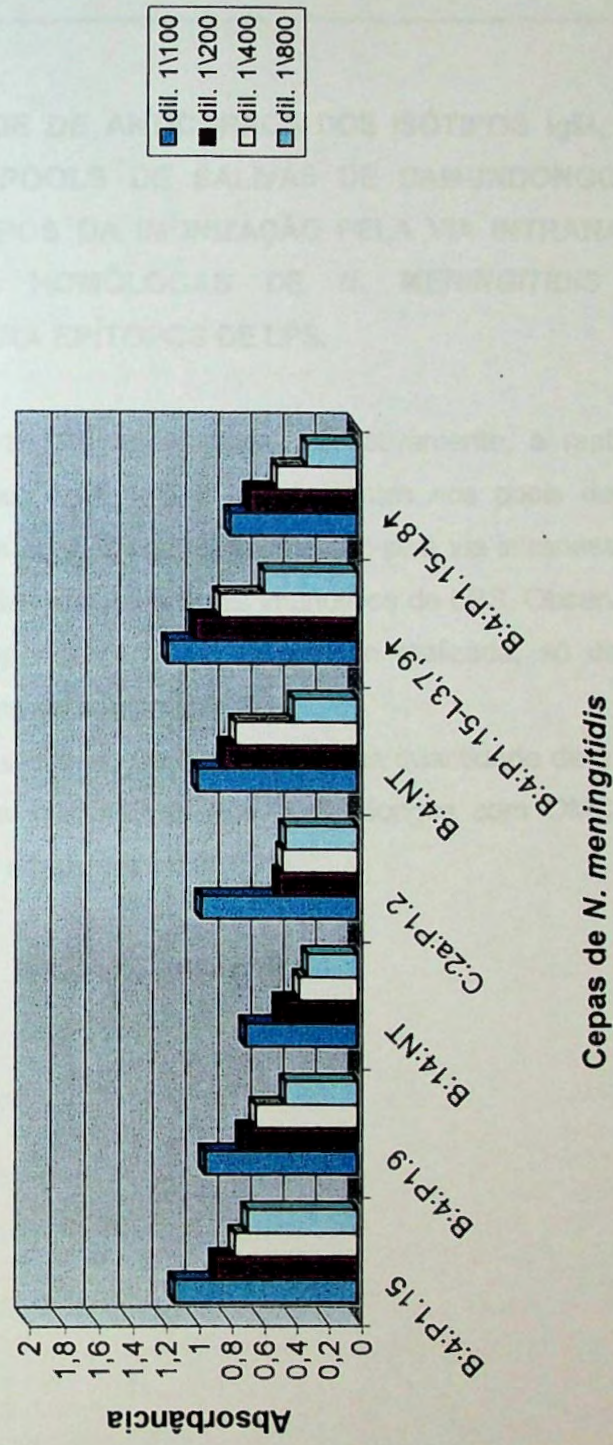


Figura 17: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgA para "whole-cells" de cepas heterólogas de *N. meningitidis*.

3.c.4 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM, IgG E IgA PRESENTES NOS POOLS DE SALIVAS DE CAMUNDONGOS BALB/c OBTIDAS 1 ANO APÓS DA IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRANASAL COM OMC DE CEPAS HOMÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS.

As figuras 18, 19, 20 apresentam, respectivamente, a reatividade dos anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos pools de salivas de camundongos obtidas após 1 ano da imunização pela via intranasal com OMC das cepas selecionadas para diferentes imunotipos de LPS. Observamos pelos resultados que, independentemente da seleção realizada, só detectamos a presença de anticorpos do isótipo IgA.

Não observamos diferenças significativas na quantidade de anticorpos do isótipo IgA presentes nas salivas dos camundongos com OMC das cepas selecionadas para os diferentes imunotipos.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgM presentes nas salivas de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

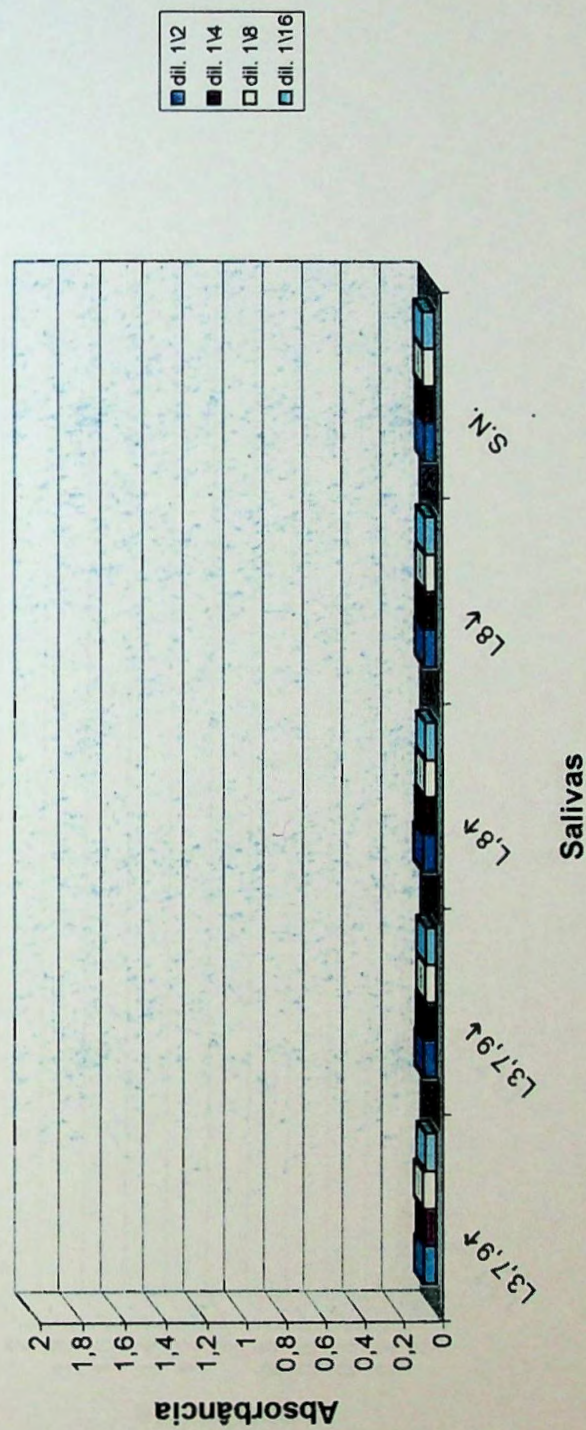


Figura 18: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgM para "whole-cells" de cepas homólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nas salivas de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

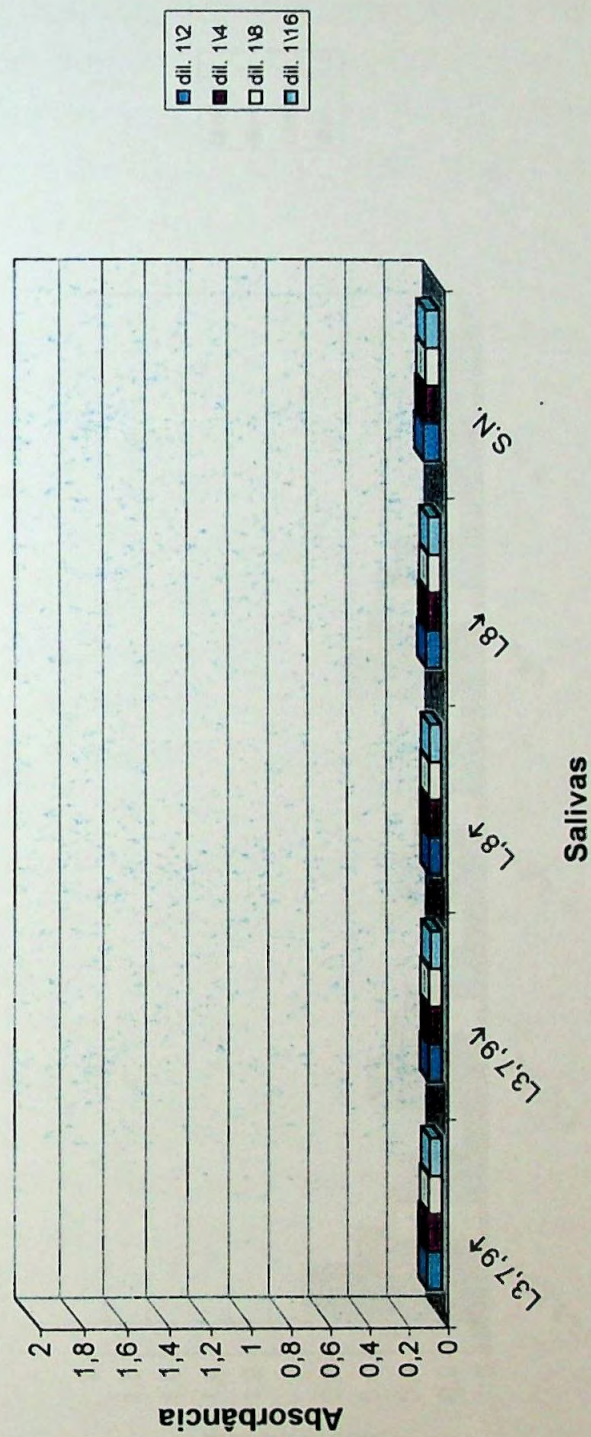


Figura 19: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgG para "whole-cells" de cepas homólogas de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgA presentes nas salivas de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

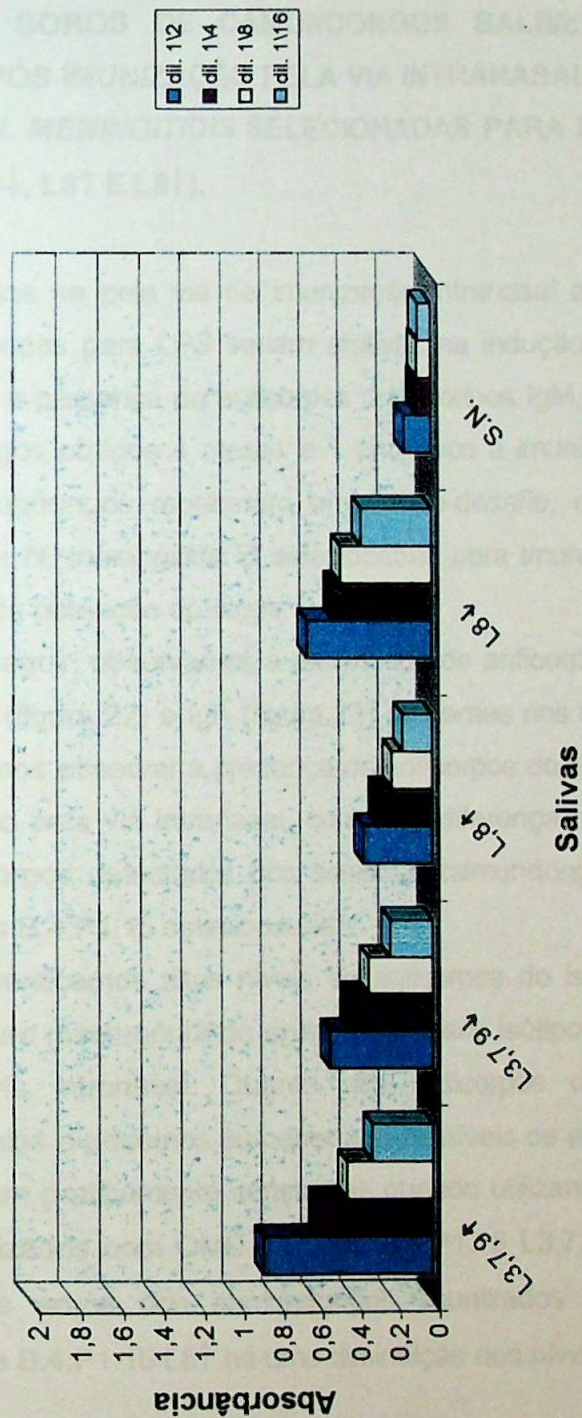


Figura 20: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgA para "whole-cells" de cepas homólogas de *N. meningitidis*.

3.c.5 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM IgG E IgA PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/c OBTIDOS 4 MESES E 1 ANO APÓS IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRANASAL COM CEPAS HOMÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS (L3,7,9↑, L3,7,9↓, L8↑ E L8↓).

Para analisarmos se pela via de imunização intranasal as preparações antigênicas selecionadas para LPS seriam efetivas na indução de células de memória, avaliamos a presença de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA nos soros de camundongos obtidos 4 meses e 1 ano após a imunização pela via intranasal. Os camundongos receberam uma dose-desafio, com OMC das cepas homólogas de *N. meningitidis B* selecionadas para imunotipos de LPS, uma semana antes da obtenção do soros.

Nas figuras a seguir, observamos a reatividade de anticorpos dos isótipos IgM (figura 21), IgG (figura 22) e IgA (figura 23) presentes nos soros utilizados neste estudo. Podemos observar a presença de anticorpos do isótipo IgM após 1 ano da imunização pela via intranasal, com uma diferença não significativa nos níveis de anticorpos detectados nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas.

Na figura 22 verificamos altos níveis de anticorpos do isótipo IgG, mas podemos observar um nível menor de anticorpos desse isótipo após 1 ano da imunização pela via intranasal. Quanto aos anticorpos do isótipo IgA, verificamos altos títulos e podemos perceber que os níveis de anticorpos desse isótipo se mantiveram praticamente constantes quando utilizamos os soros de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 L3,7,9↑ e B:4:P1.15 L8↓, enquanto nos soros dos camundongos imunizados com OMC de B:4:P1.15 L3,7,9↓ e B:4:P1.15 L8↑ há uma diminuição dos níveis de anticorpos desse isótipo.

Quanto à seleção, observamos que as maiores quantidades de anticorpos do isótipo IgG foram obtidos quando utilizamos soros de camundongos

RESULTADOS

imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 L3,7,9 $\uparrow$ e B:4:P1.15 L3,7,9 $\downarrow$, entretanto não verificamos diferenças entre cepas de maior ou menor expressão dos imunotipos analisados.

Diferenças significativas na quantidade de anticorpos do isótipo IgA e IgM não foram observadas quando utilizamos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

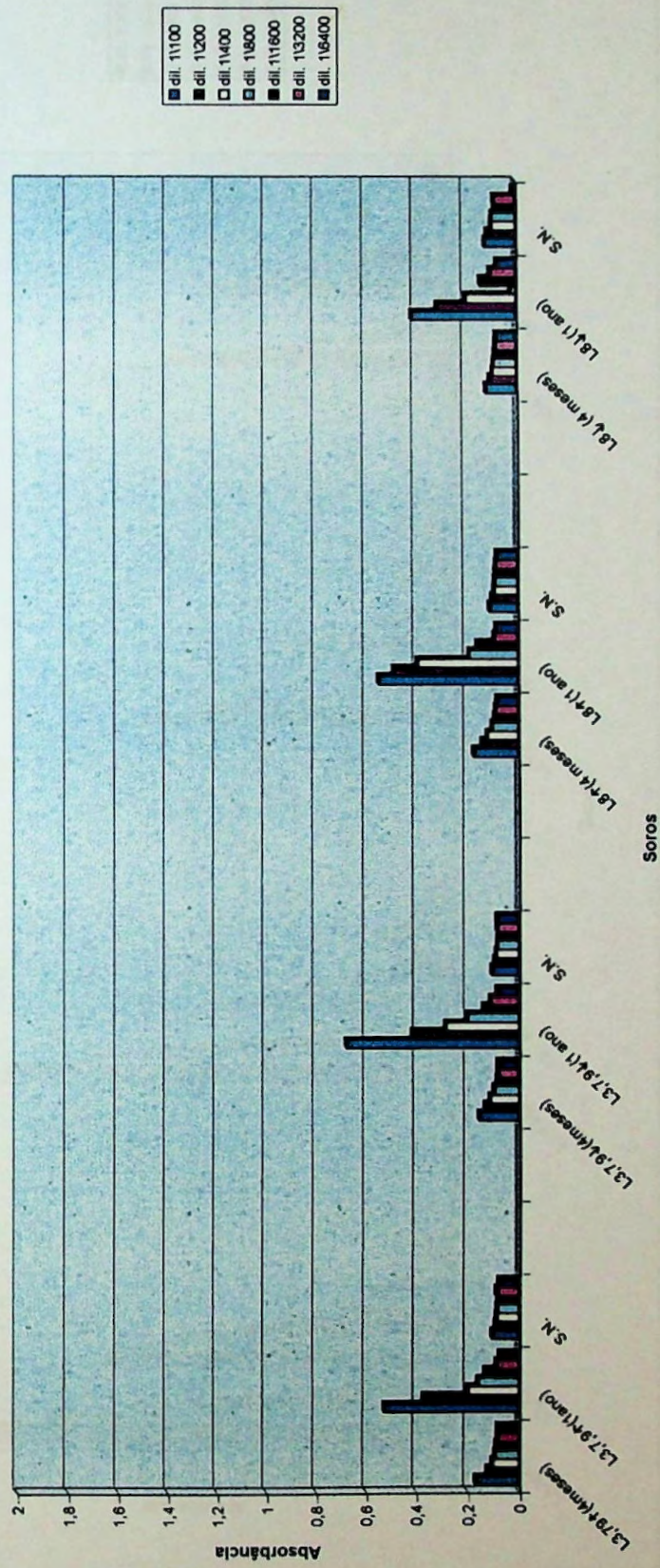
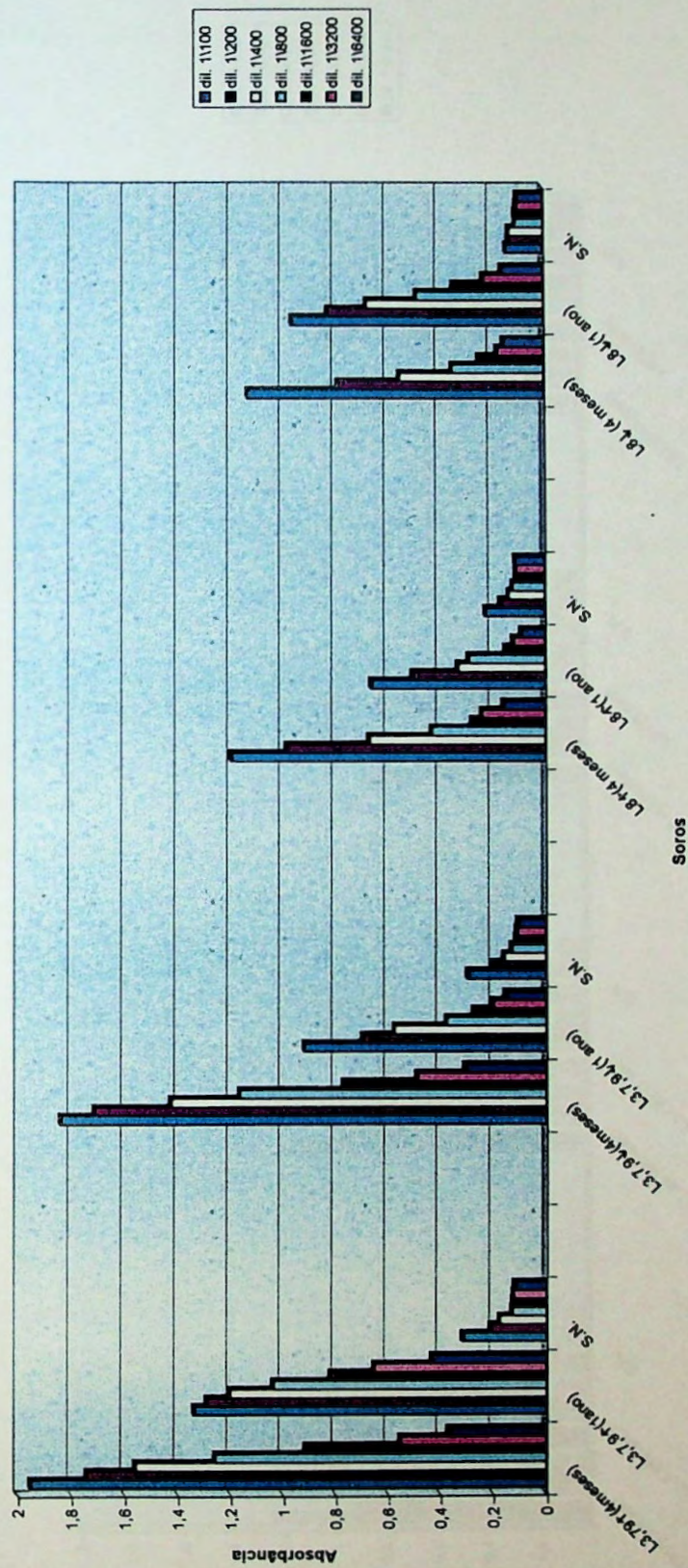


Figura 21: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgM para "whole-cells" das cepas homóloga de *N. meningitidis*.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.



Reatividade de anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC de cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para LPS.

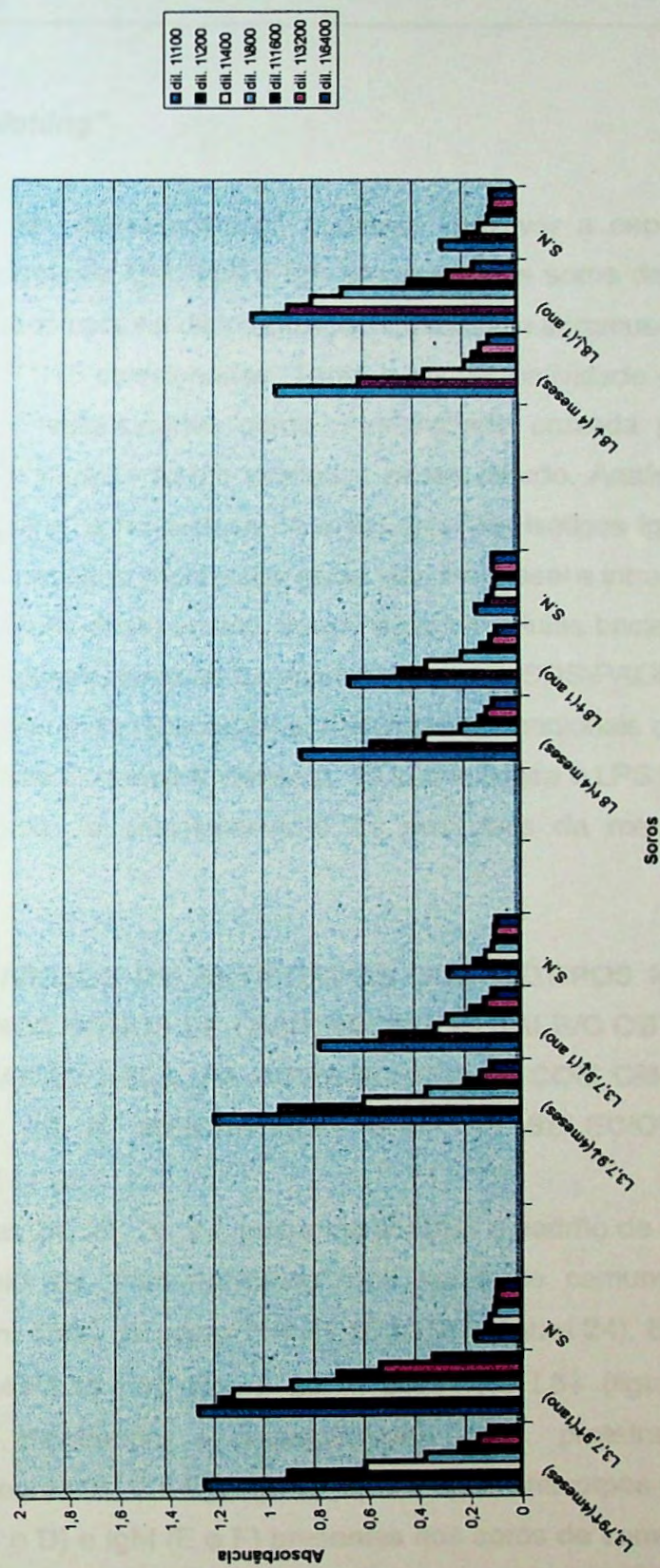


Figura 23: ELISA - Reatividade de anticorpos do isótipo IgA para "whole-cells" das cepas homólogas de *N. meningitidis*.

3d. "Immunoblotting"

Por meio de "Immunoblotting", pudemos observar a especificidade dos anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via de imunização intranasal e intramuscular com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas. Tanto a imunorreatividade específica para cepas B:4:P1.15 selecionadas como a reatividade cruzada para diferentes cepas de *N. meningitidis* foram avaliadas nesse estudo. Analisamos também por "Immunoblotting" a reatividade de anticorpos dos isótipos IgA presentes na saliva dos camundongos imunizados pelas vias intranasal e intramuscular.

Para realização deste ensaio, suspensões de células bacterianas íntegras e OMC das cepas selecionadas foram separados por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Anticorpos monoclonais contra proteínas da classe 1, classe 2, classe 4, classe 5, 50 kDa e contra o LPS foram utilizados como marcadores do posicionamento de peptídeos da membrana externa bacteriana.

3.d.1 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM, IgG E IgA PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/C OBTIDOS 30 DIAS APÓS IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRAMUSCULAR COM OMC DAS CEPAS HOMÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS:

Nas figuras 24, 25, 26, 27, podemos analisar o padrão de reconhecimento obtido por meio de "Immunoblotting" dos soros de camundongos BALB/c imunizados com OMC de cepas B:4:P1.15 L379↑ (figura 24), B:4:P1.15 L379↓ (figura 25), B:4:P1.15 L8↑ (figura 26) e B:4:P1.15 L8↓ (figura 27) pela via intramuscular, mostrando a especificidade para proteínas de células bacterianas íntegras (A, C e E) e OMC (B, D e F) de anticorpos dos isótipos IgG (A e B), IgA (C e D) e IgM (E e F) presentes nos soros de camundongos após imunizados com OMC. Nas tabelas 2 e 3, analisamos os peptídeos

RESULTADOS

reconhecidos pelos anticorpos para cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 homólogas selecionadas por anticorpos monoclonais.

Por meio de "Immunoblotting" não houve reatividade de anticorpos dos isótipos IgM e IgA para peptídeos de *N. meningitidis* das cepas selecionadas. Os anticorpos do isótipo IgG reconheceram proteínas das classes 1, 2, 5, peptídeos de 50kDa e acima de 50 kDa nas suspensão de células bacterianas íntegras e OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas.

Nas preparações antigênicas utilizadas, um número maior de peptídeos foi reconhecido por anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9↓ e B:4:P1.15 L8↑. Um padrão mais restrito de reconhecimento foi observado por anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 L379↑ e B:4:P1.15 L8↓ tanto para preparações bacterianas íntegras como para OMC de *N. meningitidis*.

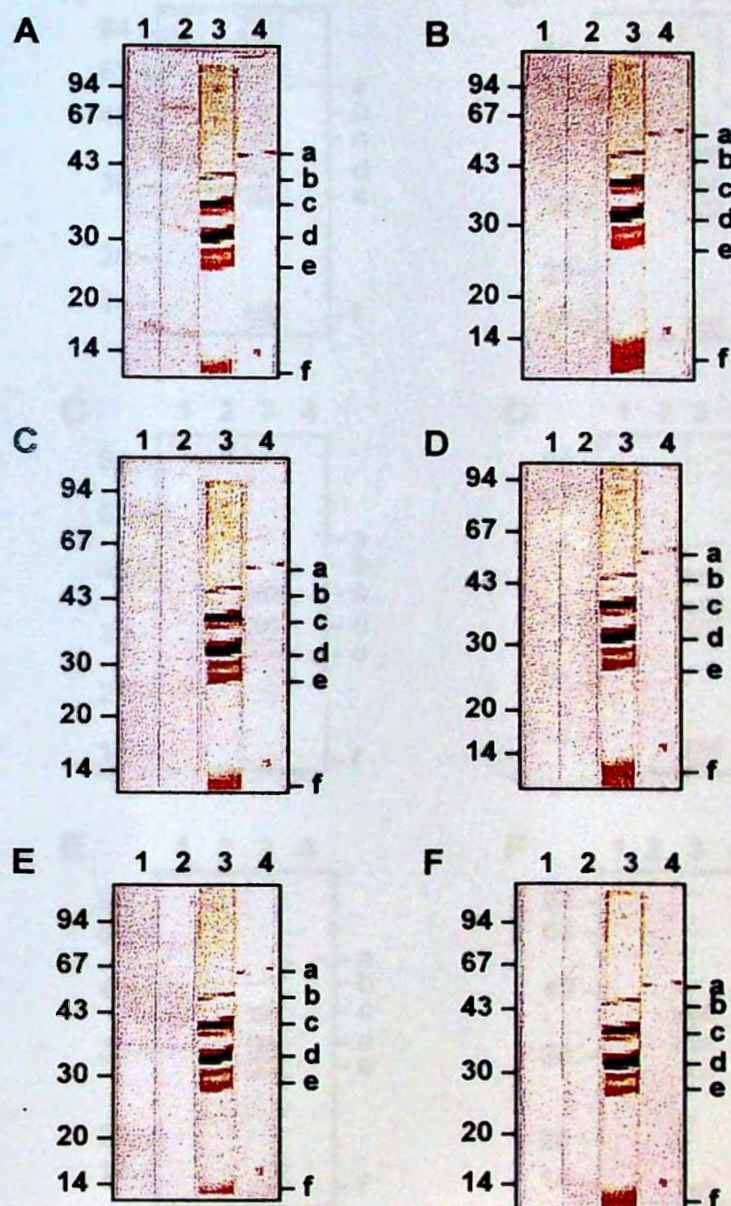


Figura 24 : Reatividade homogênea de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L379 ↑). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑). 1- 0 dia, 2- 30 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

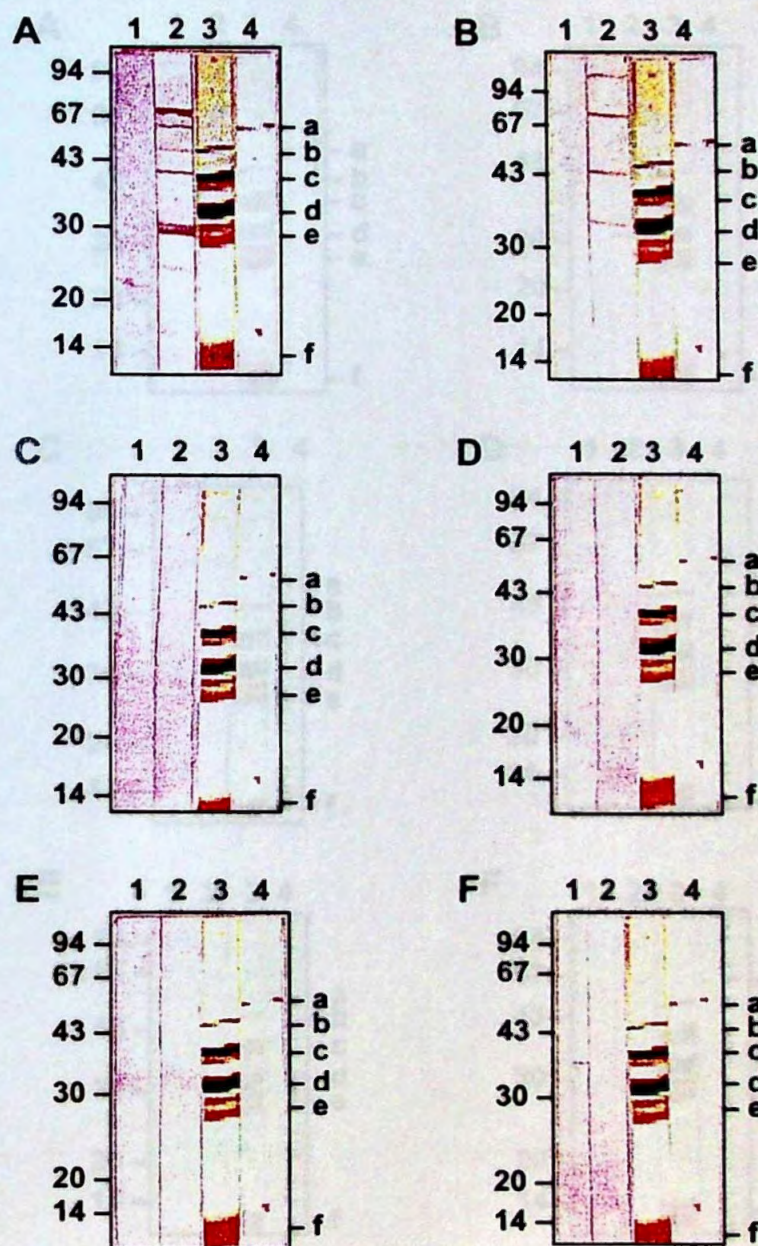


Figura 25 : Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via Intramuscular com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L379↓). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓). 1- 0 dia, 2- 30 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

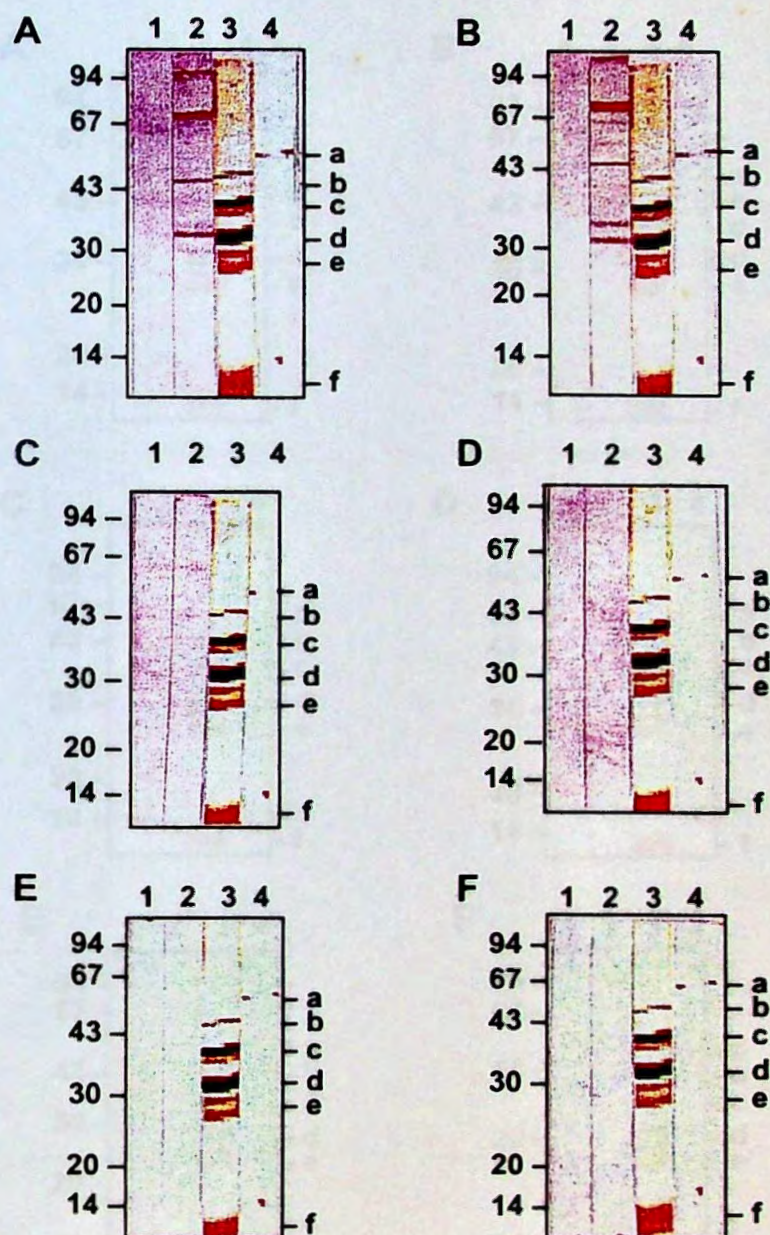


Figura 26 : Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L8 ↑). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑). 1- 0 dia, 2- 30 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

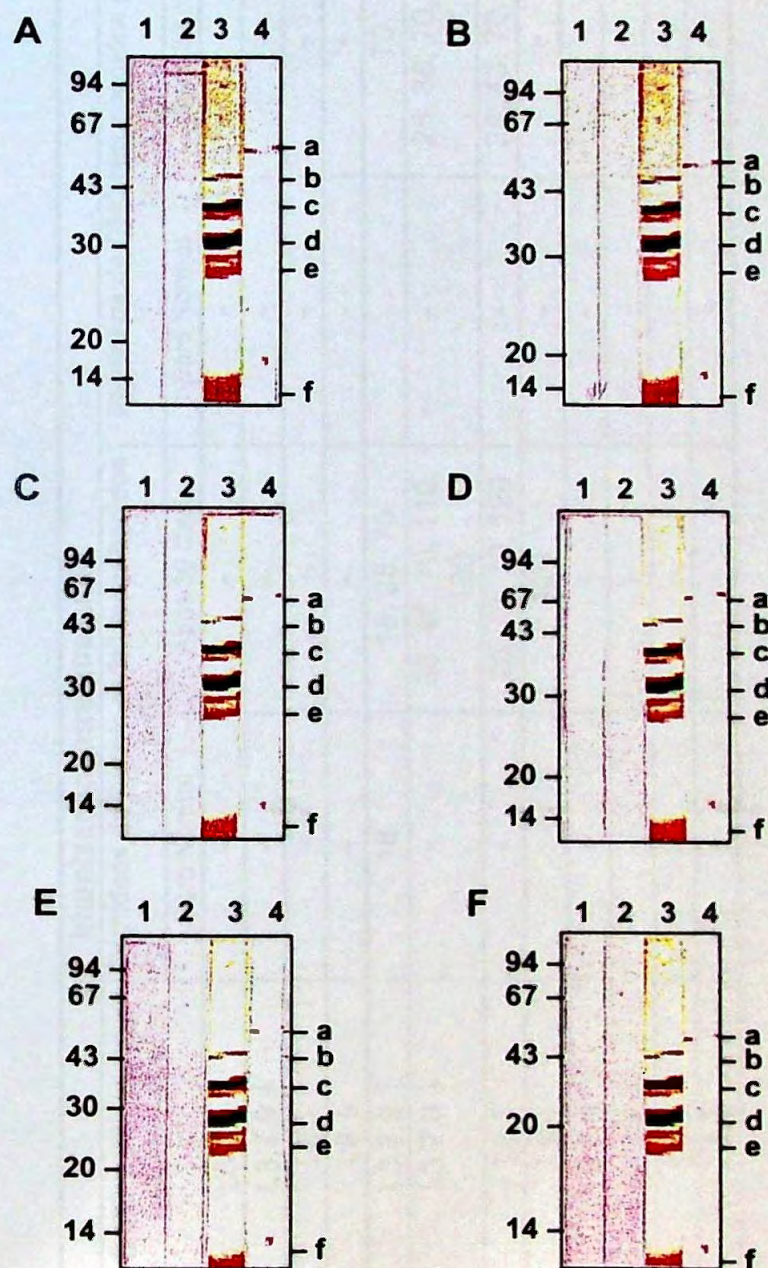


Figura 27 : Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L8 ↓). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓). 1- 0 dia, 2- 30 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

TABELA 2: Peptídeos de suspensão de células bacterianas íntegras ou OMC reconhecidos por anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intramuscular com preparações antigênicas de cepas homólogas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas para maior ou menor expressão de LPS.

Isótipo de imunoglobulina	OMC utilizada na imunização	Imunização Intramuscular			
		Peptídeos de "whole-cells" reconhecidos (kDa)		Peptídeos de OMC reconhecidos (kDa)	
		Soro Normal	Após 30 dias	Soro Normal	Após 30 dias
IgM	L3,7,9 ↑	-	-	-	-
	L3,7,9 ↓	-	-	-	-
	L8 ↑	-	-	-	-
	L8 ↓	-	-	-	-
IgG	L3,7,9 ↑	18	18, 28, 70	-	70
	L3,7,9 ↓	-	33, 46, 70, 110, 120	-	28, 38, 70, 110
	L8 ↑	-	28, 43, 70, 120	-	28, 43, 70, 120
	L8 ↓	-	120	-	-
IgA	L3,7,9 ↑	-	-	-	-
	L3,7,9 ↓	-	-	-	-
	L8 ↑	-	-	-	-
	L8 ↓	-	-	-	-

* (-): não foram reconhecidos Peptídeos.

TABELA 3: RECONHECIMENTO DE PEPTÍDEOS DE CEPAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS USANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS COMO MARCADORES. Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos 30 dias após imunização pela via intramuscular.

Grupos de camundongos	Proteínas de "whole-cells" reconhecidas	Proteínas de OMC reconhecidas
Grupo 2 (imunizado c/ L3,7,9↑)	Classe 5 (28kDa)	-
Grupo 4 (imunizado c/ L3,7,9↓)	50kDa	-
	Classe 1 (43kDa) e Classe 2 (38kDa)	Classe 1 (43kDa)
	Classe 5 (28kDa)	Classe 5 (28kDa)
Grupo 8 (Imunizado c/ L8↑)	-	-
	Classe 1 (43kDa)	50 kDa
	Classe 5 (28kDa)	Classe 1 (43kDa)
Grupo 6 (imunizado c/ L8↓)	-	Classe 5 (28kDa)
	-	-

O uso de anticorpos monoclonais como marcadores permitiu uma melhor caracterização de peptídeos de *N. meningitidis* reconhecidos por anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas para LPS.

3.d.2 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgM, IgG E IgA PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/C OBTIDOS 35 DIAS APÓS IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRANASAL COM OMC DAS CEPAS HOMÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS:

As figuras a seguir apresentam os resultados da especificidade para suspensão de células bacterianas íntegras e OMC de anticorpos presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados com OMC de cepas B:4:P1.15 L379↑ (figura 28), B:4:P1.15 L379↓ (figura 29), B:4:P1.15 L8↑ (figura 30) e B:4:P1.15 L8↓ (figura 31) pela via intranasal. Essa análise foi realizada por meio de soros de camundongos obtidos após sangria pelo plexo oftálmico no 35º dia após imunização.

As tabelas 4, 5 e 6 mostram os peptídeos de *N. meningitidis* reconhecidos pelos anticorpos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal.

O reconhecimento por anticorpos é evidente no 35º dia após a imunização, onde peptídeos na faixa de 18 à 120 kDa foram reconhecidos por anticorpos do isótipo IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC obtidos de cepas de *N. meningitidis* selecionadas. Observamos um padrão diferente de reconhecimento para “whole-cells” por anticorpos do isótipo IgG quando OMC das cepas selecionadas para maior (↑) ou menor (↓) expressão de LPS L3,7,9 e L8 foram utilizadas na imunização de camundongos. Anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC da cepa selecionada para o imunotipo L8 apresentaram um padrão mais restrito de reconhecimento de antígenos. Os peptídeos de 50 kDa e 120 kDa não foram reconhecidos por anticorpos do isótipo IgG quando OMC da cepa de menor expressão de L3,7,9 foi utilizada e os peptídeos de 38 kDa, 50 kDa e 120 kDa quando OMC da cepa de menor expressão de L8 foi utilizada.

Em relação ao reconhecimento antigênico de peptídeos de *N. meningitidis* por anticorpos do isótipo IgA (presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC de cepas selecionadas para L3,7,9 ou L8), o padrão mais complexo de reconhecimento de antígeno foi apresentado para suspensões de células bacterianas íntegras das cepas selecionadas. Diferenças quanto ao padrão de reconhecimento por anticorpos do isótipo IgA para peptídeos presentes em suspensões de células bacterianas íntegras das cepas selecionadas também foi observada. Proteínas da classe 4 foram reconhecidas por anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas com maior e menor expressão de L3,7,9.

Observamos, com a seleção para L3,7,9 e L8, um padrão mais restrito de reconhecimento de antígenos por anticorpos dos isótipos IgG e IgA quando foi utilizado OMC de cepas selecionadas, sendo que foram reconhecidos mais peptídeos acima de 50 kDa de OMC.

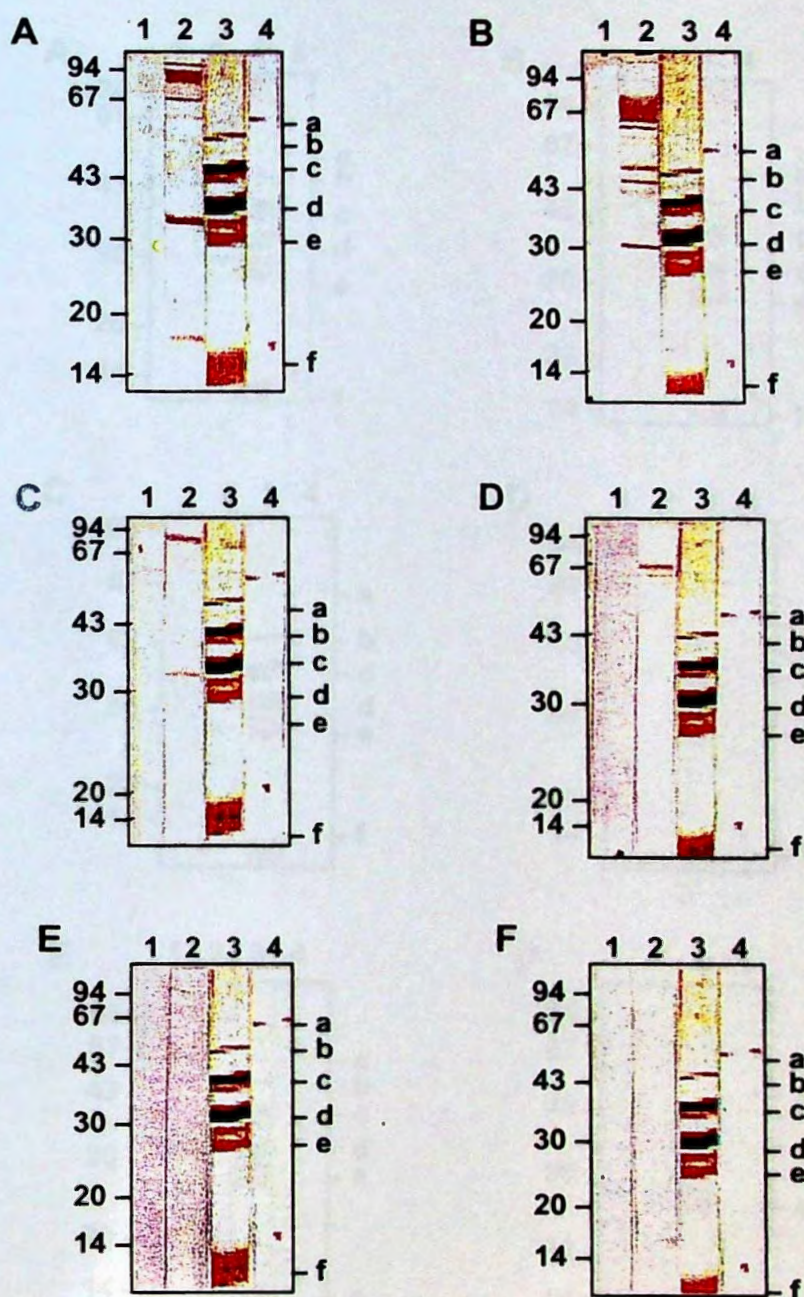


Figura 28 : Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L379 $\uparrow$). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 $\uparrow$), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 $\uparrow$), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 $\uparrow$), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 $\uparrow$), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 $\uparrow$), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 $\uparrow$). 1- 0 dia, 2- 35 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

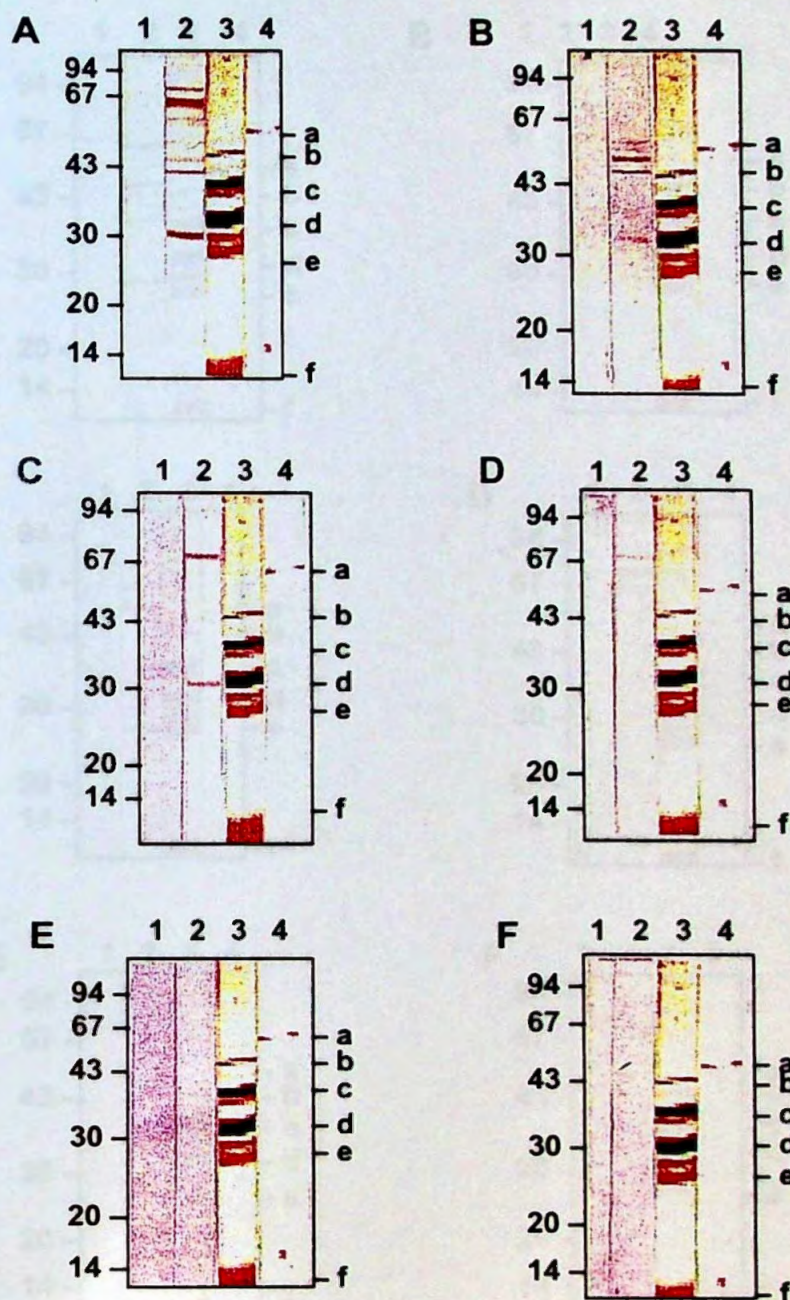


Figura 29 : Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓). 1- 0 dia, 2- 35 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

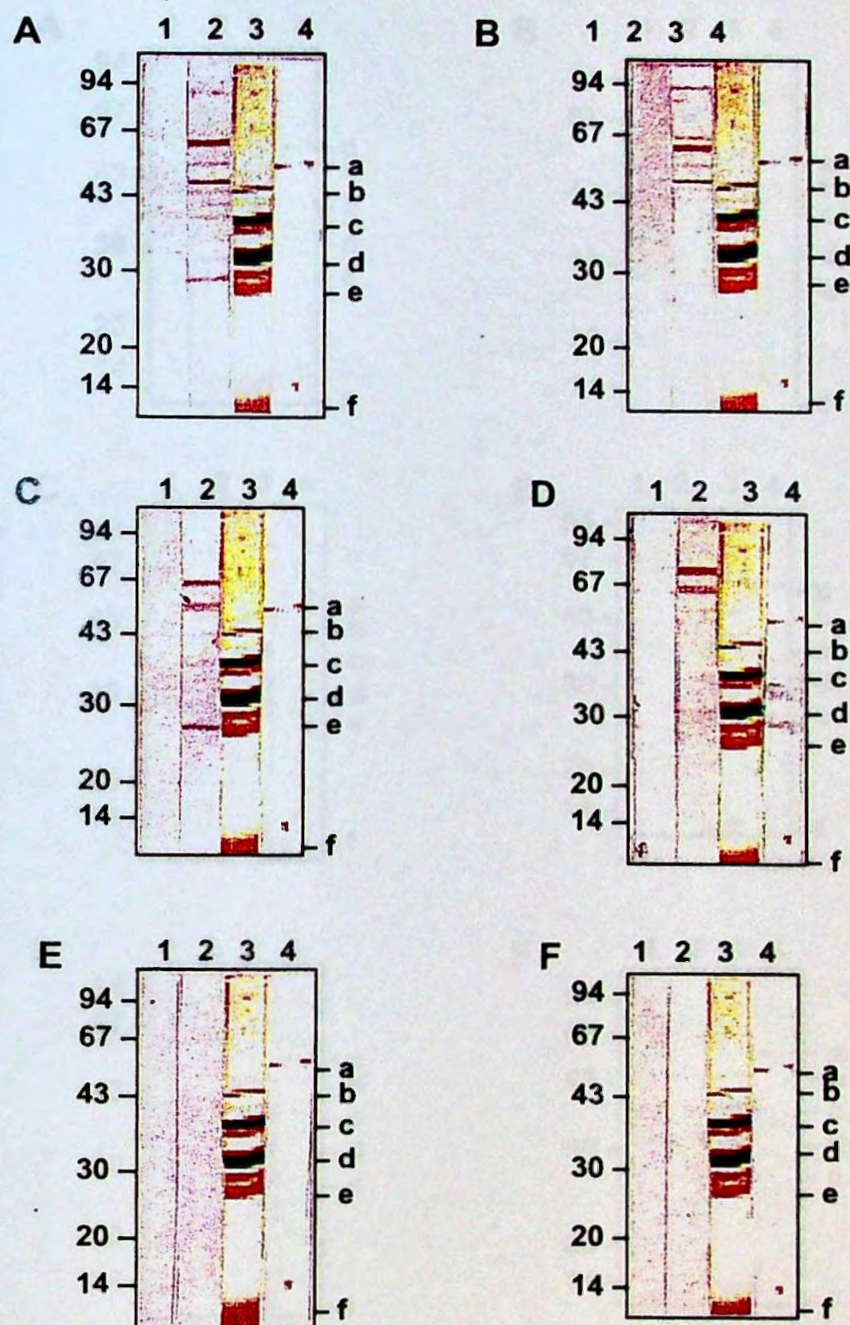


Figura 30 : Reatividade homóloga de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 $\uparrow$). 1- 0 dia, 2- 35 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

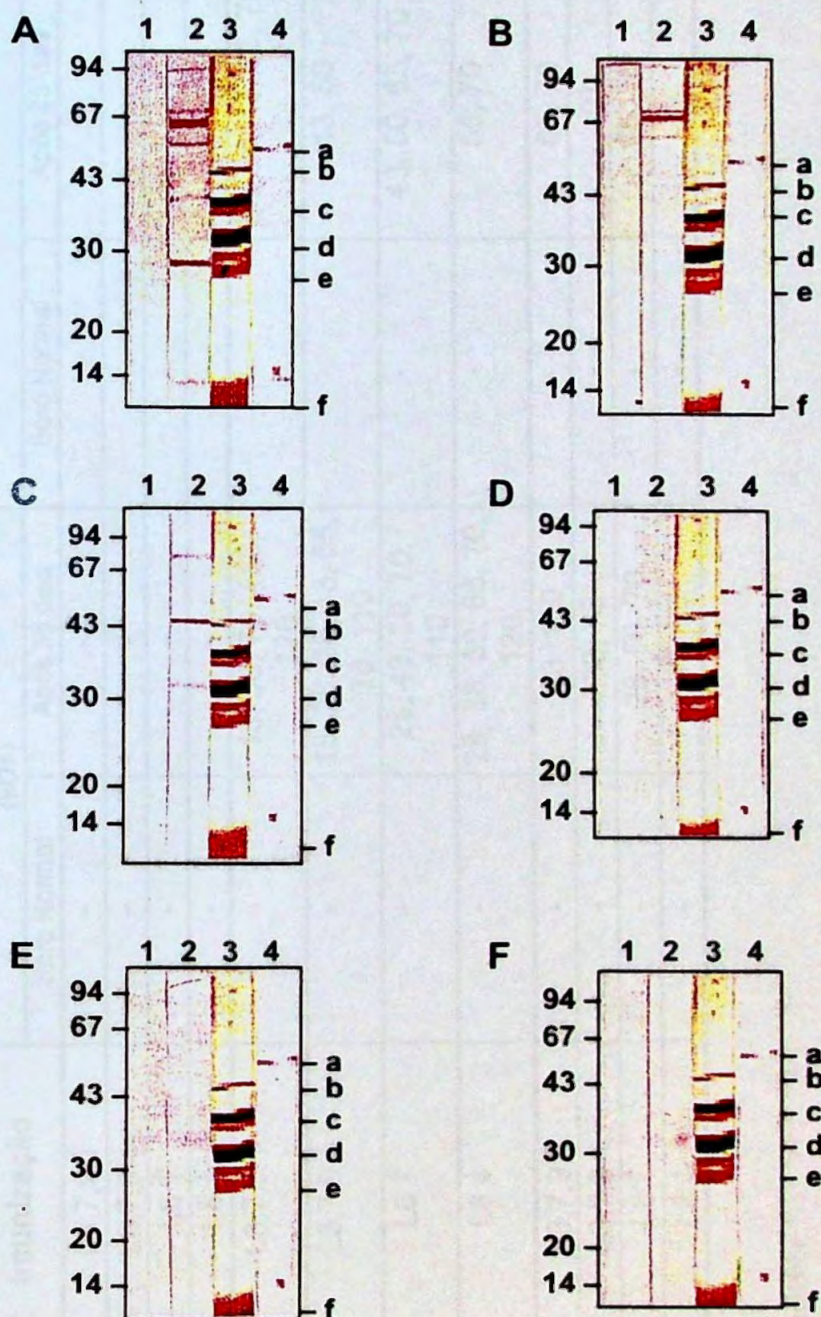


Figura 31 : Reatividade homóloga dos isótipos de anticorpos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L8 ↓). A- Reatividade de anticorpos IgG contra células bacterianas Integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), B- Reatividade de anticorpos IgG contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), C- Reatividade de anticorpos IgA contra células bacterianas Integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), D- Reatividade de anticorpos IgA contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), E- Reatividade de anticorpos IgM contra células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓), F- Reatividade de anticorpos IgM contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓). 1- 0 dia, 2- 35 dias após imunização, 3 e 4- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

TABELA 4: Peptídeos de suspensão de células bacterianas íntegras ou OMC reconhecidos por anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas para maior ou menor expressão de LPS.

Imunização Intranasal				
Isótipo de imunoglobulina	OMC utilizada na imunização	Peptídeos de "whole-cells" reconhecidos (kDa)		Peptídeos de OMC reconhecidos (kDa)
		Soro Normal	Após 35 dias	
IgM	L3,7,9 ↑	-	-	-
	L3,7,9 ↓	-	-	-
	L8 ↑	-	-	-
	L8 ↓	-	-	-
IgG	L3,7,9 ↑	-	18, 33, 70, 110, 120	28, 38, 43, 65, 70
	L3,7,9 ↓	-	18, 28, 38, 43, 65, 70, 110	43, 50
	L8 ↑	-	28, 43, 50, 70, 110	43, 50, 65, 70
	L8 ↓	-	28, 38, 50, 65, 70, 120	65, 70
IgA	L3,7,9 ↑	-	33, 110	65, 70
	L3,7,9 ↓	-	33, 70	70
	L8 ↑	-	28, 50, 70	65, 70
	L8 ↓	-	43, 70	-

* (-): não foram reconhecidos Peptídeos.

RESULTADOS

TABELA 5: RECONHECIMENTO DE PEPTÍDEOS DE SUSPENSÃO DE CÉLULA BACTERIANA ÍNTEGRA E OMC DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS USANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS COMO MARCADORES. Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos 35 dias após a imunização pela via intranasal.

Grupos de camundongos	Proteínas de "whole-cells" reconhecidas	Proteínas de OMC reconhecidas
Grupo 2 (imunizado c/ L3,7,9 ↑)	50 kDa	50 kDa
	Classe 1 (43kDa)	Classe 1 (43kDa)
	Classe 5 (28kDa)	Classe 5 (28kDa)
Grupo 4 (imunizado c/ L3,7,9 ↓)	50 kDa	50 kDa
	Classe 1 (43kDa)	Classe 1 (43kDa)
	Classe 5 (28kDa)	Classe 5 (28kDa)
Grupo 8 (Imunizado c/ L8 ↑)	50kDa	50kDa
	Classe 1 (43kDa)	
	Classe 5 (28kDa)	
Grupo 6 (imunizado c/ L8 ↓)	50kDa	-
	Classe 2	
	Classe 5	

TABELA 6: RECONHECIMENTO DE PEPTÍDEOS DAS CEPAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS USANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS COMO MARCADORES. Reatividade de anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c obtidos 35 dias após a imunização pela via intranasal.

Grupos de camundongos	Proteínas de "whole-cells" reconhecidas	Proteínas de OMC reconhecidas
Grupo 2 (imunizado c/ L3,7,9 ↑)		
	50 kDa	50kDa
	Classe 5 (28kDa)	
Grupo 4 (imunizado c/ L3,7,9 ↓)	50 kDa	
	Classe 5 (28kDa)	-
	Classe 1 (43kDa)	
Grupo 8 (Imunizado c/ L8 ↑)		-
	50 kDa	
	Classe 5 (28kDa)	
Grupo 6 (imunizado c/ L8 ↓)		-
	Classe 1 (43kDa)	

3.d.3 REATIVIDADE CRUZADA COM CEPAS HETERÓLOGAS DE *N. MENINGITIDIS* POR ANTICORPOS DOS ISÓTIPOS IgG E IgA PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL COM OMC DAS CEPAS B:4:P1.15 L3,7,9 ↑ OU B:4:P1.15 L8↑.

As figuras 32 e 33 apresentam, respectivamente, a reatividade cruzada dos anticorpos dos isótipos IgG e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 L379↑ (A), B:4:P1.15 L8↑ (B). Observamos a reatividade para células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8,1 em (1), da cepa B:4:P1.9 em (2), da cepa B:14:NT em (3), da cepa C:2a:P1.2 em (4) e B:14:NT em (5). A análise do padrão de reconhecimento de peptídeos pode ser comparada na tabela 7. Os soros utilizados neste estudo foram obtidos 4 meses após a imunização pela via intranasal.

Pelos resultados pudemos observar que os anticorpos dos isótipos IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas apresentaram uma reatividade preferencial para antígenos de alto peso molecular (na faixa de 50 a 70 kDa) das cepas heterólogas utilizadas. Quando os camundongos foram imunizados com OMC das cepas selecionadas para o imunotipo L8, uma reatividade para peptídeos de 14 kDa pode ser observada independente da seleção do imunotipo. Na análise dos "Immunoblotting" para suspensão de células bacterianas íntegras da cepa homóloga (B:4:P1.15) observamos que foram reconhecidos também peptídeos de 120 kDa e de 43 kDa (classe 1) e de 28 kDa (classe 5).

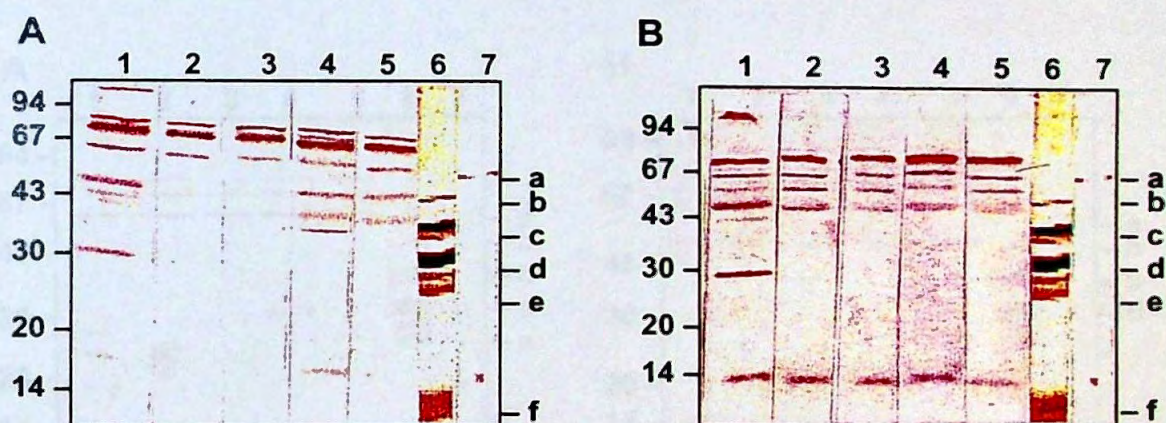


Figura 32: Estudo de reatividade cruzada de anticorpos IgG nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L3,7,9T) e B:4:P1.15 (L8T). A- soro de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9T), B- soro de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L8T), 1- reatividade para células bacterianas integras da cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8,1 não selecionada, 2- reatividade para células bacterianas integras da cepa B:4:P1.9, 3- reatividade para células bacterianas integras da cepa B:14:NT, 4- reatividade para células bacterianas integras da cepa C:2a:P1.2, 5- reatividade para células bacterianas integras da cepa B:4:NT, 6 e 7- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A, B) estão os padrões de peso molecular.

RESULTADOS

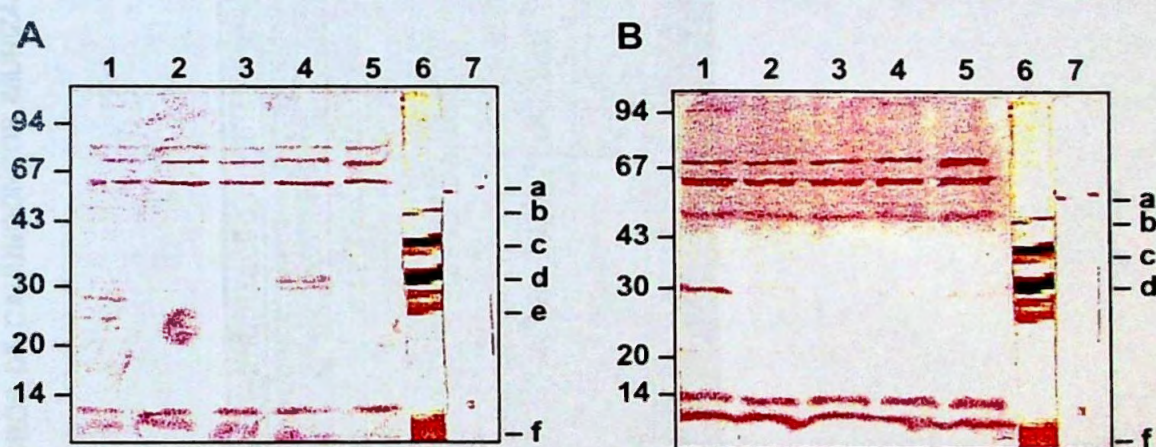


Figura 33: Estudo de reatividade cruzada de anticorpos IgA nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 (L3,7,9T) e B:4:P1.15 (L8T). A- soro de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9T), B- soro de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L8T), 1- reatividade para células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8,1 não selecionada, 2- reatividade para células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.9, 3- reatividade para células bacterianas íntegras da cepa B:14:NT, 4- reatividade para células bacterianas íntegras da cepa C:2a:P1.2, 5- reatividade para células bacterianas íntegras da cepa B:4:NT, 6 e 7- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A, B) estão os padrões de peso molecular.

TABELA 7: PEPTÍDEOS DE SUSPENSÕES DE CÉLULAS BACTERIANAS ÍNTEGRAS DE *N. MENINGITIDIS* RECONHECIDOS POR ANTICORPOS DO ISÓTIPO IgG E IgA PRESENTES NOS SOROS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL COM OMC DAS CEPAS B:4:P1.15 L3,7,9[†] E B:4:P1.15 L8[†].

Isótipo de Imunoglobulina	OMC utilizada na Imunização	Reatividade Cruzada - Imunização: Intranasal					
		Peptídeos de "whole-cells" de cepas de <i>N. meningitidis</i> reconhecidos (KDa)					
		B:4:P1.15	B:4:P1.9	B:4:NT	B:14:NT	C:2a:P1.2	
IgG	L3,7,9 [†]	LPS:33,38, 43,50,65, 70,110,120	LPS:65,70, 110	LPS:38,43, 50,65,70	LPS:28,38, 43,65,70	LPS:43, 50,65,70	
	L8 [†]	LPS:33,38, 43,46,50,70, 110	LPS:33,38, 43,46,50,70, 110	18,43,45,50, 70	LPS:43,46, 50,70	LPS:38, 43,46,50, 70,110	
IgA	L3,7,9 [†]	LPS:22,33, 70,110	LPS:18,28, 70,110	LPS:18,28, 70,110	LPS:18,28, 70,110	LPS:18, 28,33,70	
	L8 [†]	LPS:33,65, 70	LPS:43,65, 70	LPS:43,65, 70	LPS:43,65, 70	LPS:28, 43,65,70	

3.d.4 REATIVIDADE DE ANTICORPOS DO ISÓTIPO IgA PRESENTES NAS SALIVAS DE CAMUNDONGOS BALB/c OBTIDAS APÓS 1 ANO DA IMUNIZAÇÃO PELA VIA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR COM OMC DAS CEPAS B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA EPÍTOPOS DE LPS:

A figura 34 mostra a reatividade dos anticorpos do isótipo IgA presentes nas salivas de camundongos BALB/c contra suspensão de células bacterianas íntegras (figura 34-A e 34-C) e OMC (figura 34-B e 34-D) de cepas B:4:P1.15 L379↑ (1), B:4:P1.15 L379↓(2), B:4:P1.15 L8↑ (3) e B:4:P1.15 L8↓ (4) pela via intranasal (figura 34-A e 34-B) e pela via intramuscular (figura 34-C e 34-D). Na figura 34-E não podemos observar reatividade por anticorpos do isótipo IgA presentes nas salivas de camundongos normais. As tabelas 8 e 9 apresentam o padrão de peptídeos reconhecidos por anticorpos IgA na saliva de camundongos imunizados pela via intranasal.

Os peptídeos na faixa de 28 a 70 kDa foram reconhecidos por anticorpos do isótipo IgA presentes nas salivas, independentemente da seleção de LPS.

Ao compararmos os resultados obtidos com as salivas de camundongos imunizados com OMC das cepas selecionadas para LPS observamos diferenças de especificidade para suspensão de células íntegras ou OMC somente quando utilizamos salivas de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas para o LPS do imunotipo L8. Os anticorpos presentes nas salivas de camundongos imunizados com OMC de cepas selecionadas para o imunotipo L8 apresentaram um padrão de reconhecimento maior de peptídeos do que anticorpos presentes nas salivas de camundongos imunizados com OMC de cepas selecionadas para o imunotipo L3,7,9.

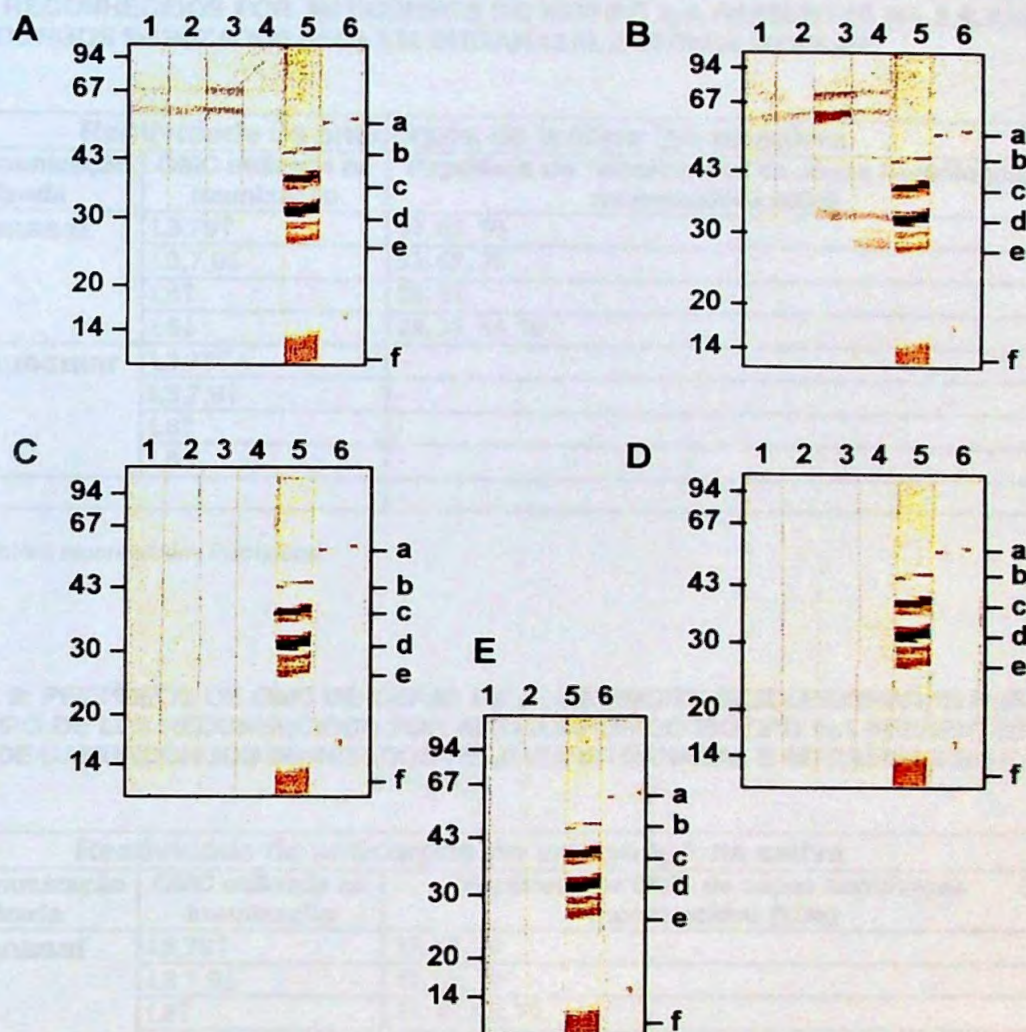


Figura 34: Estudo da indução de anticorpos IgA na saliva de camundongos BALB/c imunizados pela via intranasal com OMC das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionadas. A- Reatividade de anticorpos IgA presentes na saliva de camundongos imunizados pela via intranasal - Resposta contra células bacterianas íntegras das cepas homólogas, B- Reatividade de anticorpos IgA presentes na saliva de camundongos imunizados pela via intranasal - Resposta contra OMC das cepas homólogas, C- Reatividade de anticorpos IgA presentes na saliva de camundongos imunizados pela via intramuscular - Resposta contra células bacterianas íntegras das cepas homólogas, D- Reatividade de anticorpos IgA presentes na saliva de camundongos imunizados pela via intramuscular - Resposta contra OMC das cepas homólogas E- Reatividade IgA das saliva dos grupos normais. (1- Resposta de anticorpos contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9†). 2- Resposta de anticorpos contra OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9†). 1- resposta de anticorpos presentes na saliva de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9†), 2- resposta de anticorpos presentes na saliva de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9↓), 3- resposta de anticorpos presentes na saliva de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L8†), 4- resposta anticorpos presentes na saliva de camundongos imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 (L8↓), 5 e 6- Reatividade dos anticorpos monoclonais contra proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B: a- 50 kDa, b- classe 1 (43 kDa), c- classe 2 (40 kDa), d- classe 4 (34 kDa), e- classe 5 (28 kDa), f- contra LPS. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E) estão os padrões de peso molecular.

TABELA 8: PEPTÍDEOS DE SUSPENSÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS ÍNTEGRAS ('WHOLE-CELLS') DE CEPAS DE *N. MENINGITIDIS* B:4:P1.15 SELECIONADAS PARA O IMUNOTIPO DE LPS RECONHECIDOS POR ANTICORPOS DO ISÓTIPO IgA PRESENTES NA SALIVA DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgA na saliva		
Via de Imunização utilizada	OMC utilizada na imunização	Peptídeos de "whole-cells" de cepas homólogas reconhecidos (kDa)
Intranasal	L3,79↑	33, 65, 70
	L3,7,9↓	33, 65, 70
	L8↑	28, 33,
	L8↓	28, 33, 65, 70
Intramuscular	L3,79↑	-
	L3,7,9↓	-
	L8↑	-
	L8↓	-
SN		-

* (-): não foram reconhecidos Peptídeos.

TABELA 9: PEPTÍDEOS DE OMC DE CEPAS DE *N. MENINGITIDIS* SELECIONADAS PARA O IMUNOTIPO DE LPS RECONHECIDOS POR ANTICORPOS DO ISÓTIPO IgA PRESENTES NA SALIVA DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL E INTRAMUSCULAR.

Reatividade de anticorpos do isótipo IgA na saliva		
Via de Imunização utilizada	OMC utilizada na imunização	Peptídeos de OMC de cepas homólogas reconhecidos (kDa)
Intranasal	L3,79↑	33, 65, 70
	L3,7,9↓	33, 65, 70
	L8↑	33, 43, 65, 70
	L8↓	28, 33, 38, 43, 65, 70
Intramuscular	L3,79↑	-
	L3,7,9↓	-
	L8↑	-
	L8↓	-
SN		-

* (-): não foram reconhecidos Peptídeos.

RESULTADOS

3e. ATIVIDADE BACTERICIDA DE SOROS DE CAMUNDONGOS BALB/C IMUNIZADOS PELA VIA NASAL E INTRAMUSCULAR COM OMC DE *N. MENINGITIDIS* B SELECIONADAS PARA OS IMUNOTIPOS DE LPS L3,7,9 E L8.

Tabela 10: Títulos de atividade bactericida dos soros de camundongos imunizados pela via intranasal e intramuscular.

Cepa B:4:P1.15	Soros de camundongos		Soros de camundongos	
	<i>i.n</i> (após 35 dias)	<i>i.m</i> (após 60 dias)	<i>i.n.</i> (após 1 ano de imunização)	<i>i.m.</i> (após 1 ano de imunização)
L3,7,9 ↑	1/512	1/32000	1/1024	1/64000
L3,7,9 ↓	1/1024	1/16000	1/512	1/32000
L8 ↑	1/2048	1/64000	1/1024	1/64000
L8 ↓	1/512	1/16000	1/512	1/32000

Outro ponto de relevância no desenvolvimento de uma vacina contra o meningococo B é a avaliação da capacidade protetora dos anticorpos induzidos pela preparação vacinal que é medida por meio da atividade bactericida, ou seja, lítica dos anticorpos induzidos. Neste estudo os títulos de anticorpos bactericidas foram determinados pela diluição do soro onde houve uma redução de 50% das colônias bacterianas.

Não observamos diferenças significativas na capacidade dos anticorpos bactericidas capazes de destruir o meningococo com soros de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas para epítomos de LPS, pois, indendentemente da seleção e/ou expressão dos imunotipos de LPS, estes soros apresentaram uma boa capacidade de destruição.

RESULTADOS

* Os resultados da especificidade de anticorpos do isótipo IgG para peptídeos de suspensão de células bacterianas íntegras dos soros dos camundongos imunizados pela via intramuscular e intranasal utilizados no ensaio bactericida são mostrados na figura 35 e, na tabela 11, descrevemos os peptídeos reconhecidos por anticorpos presentes nos soros obtidos 60 dias após a imunização pela via intramuscular. A descrição dos peptídeos reconhecidos pelo soro obtidos 35 dias após imunização intranasal é mostrada na tabela 4. Observamos que os anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal e intramuscular são direcionados para peptídeos de 3, 5 a 110kDa que podem ter atividade bactericida.

TABELA 11: Peptídeos de suspensão de células bacterianas íntegras e OMC reconhecidos por anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intramuscular com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas para maior ou menor expressão dos LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8.

Imunização Intramuscular			
Isótipo de imunoglobulina	OMC utilizada na imunização	Peptídeos de "whole-cells" reconhecidos (kDa)	
		Soro Normal	Após 60 dias
IgG	L3,7,9 ↑	-	18, 28, 33, 46, 70, 110
	L3,7,9 ↓	-	LPS, 33, 43, 46, 50, 65, 70, 110, 120
	L8 ↑	-	28, 33, 43, 63, 65, 70, 110
	L8 ↓	-	LPS, 28, 46, 50, 70

* (-): não foram reconhecidos Peptídeos.

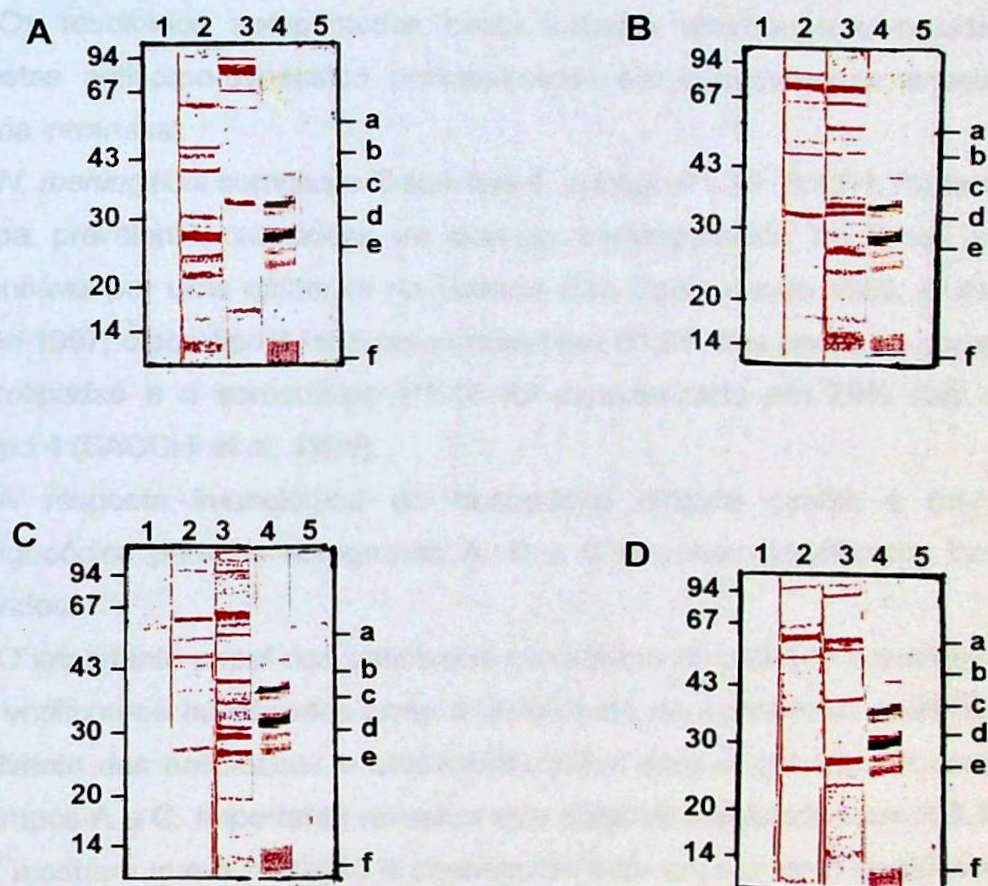


Figura 35 : Reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intramuscular com OMC da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.15 selecionada para epítomos de LPS. A- Reatividade contra suspensão de células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↑), B- Reatividade contra suspensão de células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L3,7,9 ↓), C- Reatividade contra células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↑), D- Reatividade contra suspensão de células bacterianas íntegras da cepa B:4:P1.15 (L8 ↓). 1- 0 dia, 2- 35 dias após imunização pela via intranasal, 3- 60 dias após imunização pela via intramuscular. À esquerda de cada figura (A,B,C,D,E,F) estão os padrões de peso molecular.

IV- DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho abordaram o estudo das respostas anticorpo-específico principalmente em camundongos imunizados pela via intranasal.

N. meningitidis sorogrupo B sorotipo 4, subtipo P1.15 (B:4:P1.15) tem sido a cepa prevalente causadora da doença meningocócica no Brasil e é a responsável por uma epidemia na Grande São Paulo desde 1998. Durante o ano de 1997, o sorotipo 4 foi o responsável por 81,2% das cepas do sorogrupo B sorotipadas e o sorosubtipo P1.15 foi caracterizado em 79% das cepas sorotipo 4 (SACCHI et al, 1998).

A resposta imunológica do hospedeiro dirigida contra a meningite meningocócica para os sorogrupos A, B e C envolve mecanismos inatos e adquiridos.

O importante papel dos anticorpos no sistema de defesa foi demonstrado, onde verificou-se há décadas atrás a efetividade da soroterapia antes mesmo do advento dos antibióticos e atualmente pelas vacinas produzidas contra os sorogrupos A e C. Importante ressaltar que estudos conduzidos por PELTOLA, 1998, mostram que a proteção é conseguida com um aumento significativo do nível de anticorpos circulantes.

Observa-se que, na grande maioria dos indivíduos, a imunidade inata tem garantido a prevenção da doença meningocócica. Contudo, para crianças na faixa etária entre 6 meses e dois anos de idade e indivíduos imunodeficientes, o papel dos anticorpos bem como do Sistema complemento se mostram fundamentais. Nota-se que a imunidade proporcionada especificamente por anticorpos bactericidas decai rapidamente após o nascimento e aos 6 meses de idade quando a susceptibilidade da infecção se torna mais alta.

A imunidade é predominantemente adquirida como resultado da exposição aos antígenos meningocócicos (entre eles proteínas e lipoproteínas) encontrados na superfície externa do microrganismo (PELTOLA, 1998;

POLLARD & FRASCH, 2001). Estes antígenos são expressos também por cepas de meningococos não patogênicas e outros microrganismos que tenham antígenos homólogos aos da *N. meningitidis*.

Os inúmeros trabalhos realizados visando ao combate da meningite meningocócica B dão ênfase à importância destes antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora e duradoura, especialmente na infância, ocasião em que os indivíduos estão mais susceptíveis ou predispostos a adquirir infecção. Sem esquecer também dos capazes de induzir anticorpos que se ligam às estruturas bacterianas e ativam os componentes do complemento levando mecanismos como a fagocitose (POLLARD & FRASCH, 2001).

Entre as diversas estruturas bacterianas capazes de induzir no hospedeiro resposta imunológica inata e/ou adquirida, a cápsula merece atenção especial. Pode-se afirmar que a cápsula seria dentre esses antígenos a estrutura mais adequada, simplificando a produção de vacina por ser um antígeno comum a todos os membros de um sorogrupo. Consideramos pertinente comentar que em uma epidemia estão envolvidas cepas de meningococos de vários sorotipos, subtipos e imunotipos, portanto uma vacina voltada para o antígeno capsular que é comum a todos os sorogrupos resolveria o problema; entretanto, ao pensarmos principalmente no sorogrupo B, devemos comentar que esta prática de ação seria pouco efetiva pelo fato de ser pouco imunogênico e apresentar características já descritas anteriormente.

O insucesso da utilização de antígenos capsulares para o sorogrupo B fez com que novos antígenos de superfície externa bacteriana se tornassem alvo de estudos. Ressalta-se a importância de antígenos envolvidos nos mecanismos de adesão e invasão das células epiteliais, entre elas OpA e OpC, proteínas expressas em condições restritas de ferro ("iron regulated proteins"), porinas (proteínas da classe 1, 2 ou 3), proteínas de 50 kDa e há ainda pesquisas com as NspA ("*Neisserial surface protein A*"). Entretanto os resultados obtidos com estes componentes foram pouco promissores.

Apesar dos avanços tecnológicos, muito pouco se sabe sobre os mecanismos que levam à baixa eficácia destes antígenos dirigidos contra os isolados do sorogrupo B. Fatos como a incapacidade ou dificuldade de reproduzir as condições "in vivo" capazes de iniciar a imunidade natural ou ainda a não inclusão nas preparações vacinais de antígenos relevantes responsáveis pelo estímulo de uma resposta satisfatória e duradoura para *N. meningitidis* B, são considerados preponderantes na ineficácia das preparações vacinais até agora desenvolvidas.

Apesar de, até o momento, não termos encontrado o antígeno que proporcione um nível de eficácia ideal, algumas preparações vacinais foram desenvolvidas e vêm sendo utilizadas contra o meningococo B (CLAASEN et al., 1986; SIERRA et al., 1990; BJUNE et al., 1991; BOSLESGO et al., 1995). O principal objetivo das pesquisas é alcançar uma formulação efetiva que atue em dose única e que induza proteção duradoura (especialmente na porta de entrada do microrganismo), dispensando assim o uso de seringas e diminuindo o custo de produção. Assim, diversos grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços para a pesquisa de preparações vacinais que estimulem a imunidade pela via de mucosas (SAUNDERS et al., 1999; HANEBERG et al., 2001; KATIAL et al., 2002).

Um dos objetivos do presente estudo foi analisar a possível atividade protetora dos LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8 na resposta imune por meio da avaliação da resposta dos anticorpos em camundongos BALB/c imunizados com OMC de cepas B:4:P1.15 mutantes para esses imunotipos (B:4:P1.15 L3,7,9[↑], B:4:P1.15[↓], B:4:P1.15[↑] e B:4:P1.15[↓] que foram obtidas através da seleção por "colony-blot" utilizando anticorpos monoclonais.

Além do L3,7,9 e L8 serem imunotipos prevalentes na grande maioria das cepas frequentemente isoladas em nosso meio, estes podem ser importantes como adjuvantes. Estudos realizados em nosso laboratório mostram uma prevalência de 98% do imunotipo L3,7,9 e de 15% do imunotipo L8 nas cepas de meningococo do sorogrupo B analisadas (BELO et al., 2001). Estudos

descritos na literatura não excluem também a existência de diferenças na composição ou no grau de sialilação de LOS (porção polissacarídica constituinte dos LPS) dessas cepas que podem ser capazes de interferir na exposição de antígenos alvos aos anticorpos e/ou ativação do sistema complemento (FRANK et al, 1987; VOGEL et al., 1997).

Escolhemos para nosso trabalho a cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8 por ser esta cepa de maior incidência nas epidemias ocorridas no Brasil e por expressar os imunotipos L3,7,9 e L8. Pela comparação entre o perfil eletroforético da cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8 visto por meio da coloração da prata e o perfil eletroforético do LPS purificado, podemos observar que esta amostra contém peptídeos que apresentam a mesma massa molecular dos LPS purificados, sugerindo que a banda observada é de LPS. A análise da reatividade dos anticorpos monoclonais anti-L3,7,9 e anti-L8 para os LPS purificados mostra que estes anticorpos reconheceram os respectivos LPS L3,7,9 (4,5 kDa) e L8 (3,6kDa).

Após a caracterização da cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8, foi feita a seleção para maior ou menor expressão dos LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8 por meio de "colony-blot" e da porcentagem de expressão desses imunotipos de LPS por meio de citometria de fluxo. Comparando os resultados da porcentagem de expressão de LPS contido nas suspensões de células bacterianas íntegras das cepas B:4:P1.15 não selecionadas e com maior expressão dos imunotipos L3,7,9 e L8 podemos observar que há uma maior porcentagem de LPS nas suspensões das cepas selecionadas, mostrando que fomos capazes de selecionar colônias da cepa B:4:P1.15 que expressam maior quantidade de LPS L3,7,9 e L8. Já os resultados obtidos com cepas de menor expressão de LPS L3,7,9 e L8 mostram que há um residual desses imunotipos nas colônias selecionadas, ou seja, por "colonyblot" não houve a seleção de colônias que não expressassem os imunotipos L3,7,9 e L8. Embora esperássemos que a falta de reatividade por "colonyblot" evidenciada pela ausência de coloração da cópia da colônia na membrana indicasse que não houve expressão dos imunotipos L3,7,9 e L8 nas cepas selecionadas para menor expressão desses

imunotipos, pudemos observar por meio de citometria de fluxo (uma técnica com maior sensibilidade) uma pequena porcentagem de expressão dos LPS estudados (1,3% de L3,7,9 e 0,72% de L8). Este residual de LPS pode ser atribuído a uma pequena população bacteriana dentro da colônia selecionada que continua a expressar os imunotipos L3,7,9 e L8.

O perfil da resposta imunológica foi analisado pela pesquisa de anticorpos circulantes presentes no soro e na saliva de camundongos imunizados com OMC de *N. meningitidis* empregando-se a técnica de ELISA, que foi realizada com suspensão de bactérias inteiras mortas com azida sódica e que permitiu a detecção de anticorpos dos isótipos IgM, IgG e IgA de reatividade específica e cruzada presentes nos soros e na saliva e dirigidos para antígenos de superfície externa bacteriana do meningococo. A técnica de "*Immunoblotting*", realizada com preparações antigênicas de bactérias (suspensão de células bacterianas íntegras e OMC) permitiu a avaliação qualitativa da especificidade dos anticorpos (induzidas por OMC das cepas selecionadas).

Após quatro doses por imunização intranasal e três doses pela via intramuscular observamos por ELISA e "*Immunoblotting*" uma forte reatividade de anticorpos dos isótipos IgG e IgA presentes no soro de camundongos. Após a quarta dose de imunização, pela via intranasal, verificamos que esta via foi capaz de induzir também uma resposta sistêmica. Verificamos por meio da presença de anticorpos do isótipo IgA na saliva que a imunização pela via intranasal foi capaz de induzir células B produtoras do isótipo IgA nos sítios efetores de mucosa. Altos níveis de anticorpos do isótipo IgG foram detectados nos soros de camundongos imunizados pela via intramuscular, contudo não detectamos anticorpos do isótipo IgA nem no soro nem na saliva dos camundongos. Os resultados mostram que ao contrário do observado pela via intranasal a via intramuscular não foi capaz de induzir uma resposta de mucosa. Estes dados estão de acordo com outros trabalhos que utilizaram a via de imunização intranasal com o meningococo do sorogrupo B (HANEBERG et al., 1998; SAUNDERS et al., 1999) ou outro microrganismo (BAQAR et al, 1996).

Recentemente, KATIAL et al., 2002, avaliando a imunogenicidade de uma preparação vacinal baseada em OMV de uma cepa mutante de *N. meningitidis* acapsulada observou um aumento nos títulos de anticorpos tanto do isótipo IgG como do isótipo IgA no soro de indivíduos analisados. HANEBERG et al., 1998, previamente obtiveram os mesmos resultados administrando OMV da cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.16 pela via intranasal.

Em nossos estudos não foi observada resposta de anticorpos do isótipo IgM nos soros de camundongos imunizados tanto pela via nasal ou intramuscular. A não detecção de anticorpos do isótipo IgM se deve provavelmente ao dia escolhido para análise (aproximadamente 30º dia após a imunização), onde não se verifica mais anticorpos desse isótipo. Entretanto pudemos detectar anticorpos do isótipo IgM em nossos estudos de avaliação de resposta imunológica. Nesses estudos, o soro dos camundongos foi analisado sete dias após um "challenge". Provavelmente anticorpos IgM puderam ser detectados devido à estimulação de novos clones de células .

Altos níveis de anticorpos IgG e IgA reconheceram antígenos presentes na suspensão de células bacterianas íntegras das cepas B:4:P1.15 L3,7,9,8; B:4:P1.19; B:4:NT; B:14:NT e C:2a:P1.2, por meio de ELISA; portanto podemos constatar que a OMC das cepas com maior expressão de L3,7,9 e L8 foram capazes de induzir a produção de anticorpos de reatividade cruzada para diferentes antígenos destas cepas.

Verificamos ainda por meio de ELISA que houve a detecção de anticorpos presentes nos soros de camundongos após 4 meses e 1 ano, mostrando que a OMC foi capaz de induzir clones de células de memória. Deve-se salientar que a maioria das células B dentro de uma população clonal ativada revertem em células de memória que podem sobreviver por anos e quando ativadas sofrem novos ciclos de replicação formando novas células de memória garantindo assim a defesa contra um determinado microrganismo. Por isso no desenvolvimento de vacinas efetivas para qualquer patógeno é realizada a análise da persistência de anticorpos. Um dos pontos-chaves é verificar se a

preparação antigênica utilizada foi capaz de induzir células de memória. Os resultados obtidos por meio de ELISA mostram que soro obtido após 4 meses ou 1 ano após imunização com as OMCs de todas as cepas B:4:P1.15 utilizadas neste estudo induziram anticorpos dos isótipos IgG e IgA. Estes achados indicam portanto que nossas preparações antigênicas das cepas B:4:P1.15 selecionadas para epítomos de LPS foram capazes de induzir pela via intranasal após um ano clones de células B produtores de anticorpos.

Os resultados da especificidade de anticorpos por "*Immunoblotting*" foram evidenciados no 30º dia após a imunização. Neste estudo verificamos também que a resposta foi dirigida para antígenos principalmente da classe 1, 2, 5, proteínas de 50 kDa e peptídeos de alto peso molecular. Estas proteínas, como sabemos, são importantes na indução de uma resposta imune efetiva contra o meningococo do sorogrupo B. As proteínas da classe 1 e 2 são importantes na indução de anticorpos bactericidas, bem como as proteínas da classe 5 que, além de participar no processo de adesão do microrganismo à células da mucosa do hospedeiro, induzem anticorpos bactericidas e as proteínas acima de 50kDa são conhecidas como produtoras de anticorpos de reatividade cruzada para diferentes cepas de *N. meningitidis*.

Contudo, tanto pela via de imunização intramuscular como pela via intranasal, verificamos diferenças na especificidade dos anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados com OMC das cepas selecionadas, destacando-se:

- Os anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de animais imunizados com OMC da cepa B:4:P1.15 L3,7,9↓ e B:4:P1.15 L8↑ apresentaram um padrão de reconhecimento maior para antígenos de suspensão de células bacterianas íntegras das cepas homólogas.

- Pela via de imunização intranasal, anticorpos do isótipo IgG presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9↑ e B:4:P1.15 L8↑ apresentaram um reconhecimento antigênico maior quando foi utilizada OMC.

- a resposta da especificidade dos anticorpos do isótipo IgA mostra um padrão de reconhecimento (tanto para suspensão de células bacterianas íntegras como para OMC) maior quando utilizamos na imunização OMC de cepas com maior expressão de L8.

Um outro dado a ser salientado é que na preparação antigênica utilizada em nosso trabalho pela via intranasal, não houve indução de anticorpos dos isótipos IgG e IgA direcionados para proteína da classe 4 quando os camundongos foram imunizados com OMC de cepas com maior ou menor expressão de L8; sugestivo de que não há indução de anticorpos bloqueadores para outras proteínas. Este fato é de extrema relevância visto que as vacinas existentes para *N.meningitidis* B administradas pela via parenteral mostram que essas proteínas induzem anticorpos reconhecidos como bloqueadores.

Quando utilizamos suspensão de células bacterianas íntegras das cepas de *N. meningitidis* B:4:P1.15 não selecionadas para LPS das cepas B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT e C:2a:P1.2, não pudemos observar diferenças na especificidade de anticorpos do isótipo IgG e IgA para peptídeos de alto peso molecular utilizando soros de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 L3,7,9 ↑ e B:4:P1.15 L8 ↑. Proteínas, principalmente em torno de 70 kDa, são descritas na literatura como proteínas reguladas pelo ferro que são expressas por várias cepas de meningococos e induzem anticorpos bactericidas. Trabalhos de PINTOR et al., 1996, TRANCOSO et al., 2000, mostram que estas proteínas de alto peso (entre 60 a 100kDa); as "*iron regulated proteins*", são comuns a várias cepas de meningococos. Nossos resultados sugerem que a reatividade dos anticorpos IgG e IgA contra suspensão de células bacterianas íntegras das cepas B:4:P1.15 L3,7,9,8; B:4:P1.19; B:4:NT; B:14:NT e C:2a:P1.2 que proteínas contida nessas suspensões sejam comuns entre essas cepas e portanto importantes devido à possibilidade de indução de anticorpos de reatividade cruzada. Observamos ainda que os anticorpos do isótipo IgG e IgA presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas com maior

expressão de L3,7,9 e L8 reconheceram a proteína da classe 1 somente na cepa B:4:P1.15 L3,7,9,8 utilizadas em nossos estudos, mostrando que esta é específica desta cepa.

Os anticorpos do isótipo IgA presentes na saliva dos camundongos imunizados pela via nasal apresentam especificidade para proteínas de alto peso molecular e observamos que nas salivas de camundongos imunizados pela via intranasal com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas para maior ou menor expressão do LPS do imunotipo L8 os anticorpos presentes reconheceram os peptídeos de classe 5.

A capacidade protetora dos anticorpos foi verificada através do ensaio que mede a atividade lítica dos anticorpos mediada pelo complemento. Pudemos observar pelos títulos bactericidas obtidos por meio deste ensaio que houve a indução de anticorpos que causam a lise da bactéria por meio da ativação do Sistema complemento.

GOLDSCHENEIDER et al., 1969, sugeriram que os títulos mínimos de anticorpos bactericidas suficientes para fornecer proteção seriam ≥ 4 para o sorogrupo C utilizando complemento humano. Considerando que (segundo dados da literatura; principalmente de estudos pré-clínicos de imunogenicidade de preparações vacinais existentes contra os meningococos dos sorogrupos A, B e C) títulos bactericidas acima de 1:4 mostram-se significativos para a eliminação do meningococo, podemos concluir que os títulos de anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados pela via nasal são bastante satisfatórios.

Embora não tenhamos observado diferenças significativas entre os soros de camundongos imunizados com OMC das cepas B:4:P1.15 selecionadas, verificamos que os títulos apresentados podem ser efetivos no combate do meningococo do sorogrupo B. Devemos salientar também a permanência de altos títulos bactericidas até 1 ano tanto nos soros de camundongos imunizados pela via intranasal como intramuscular, isto é a preparação antigênica induziu células de memória que produziram anticorpos com atividade bactericida.

Com a análise de nosso trabalho verificamos pontos considerados importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra o meningococo do sorogrupo B. A OMC selecionada para maior ou menor expressão dos LPS L3,7,9 e L8 induziu anticorpos principalmente do isótipo IgG e IgA de reatividade específica e cruzada e com atividade biológica (capacidade lítica). E os melhores resultados apresentados com soros de camundongos imunizados com OMC de cepas com maior expressão dos LPS L3,7,9 e L8 vem ressaltar que a seleção e o estabelecimento dos imunotipos podem ser importantes na produção de uma vacina meningocócica capaz de induzir uma imunidade duradoura, em todas as idades, pela via de mucosa.

CONCLUSÃO

V- CONCLUSÃO

Em nossos estudos utilizando camundongos BALB/c imunizados com OMC das cepas selecionadas para maior ou menor expressão dos imunotipos de LPS de *N. meningitidis* L3,7,9 e L8 podemos concluir que:

- OMC das cepas com maior ou menor expressão de imunotipos de LPS quando administradas pela via intranasal foram capazes de induzir tanto a imunidade mucosa como sistêmica. Essa imunidade foi evidenciada principalmente pelos níveis de anticorpos (dos isótipos IgG e IgA) presentes no soro e na saliva dos camundongos imunizados pela via intranasal e intramuscular. Ao contrário do apresentado pela via intranasal, na imunização pela via intramuscular só observamos resposta de anticorpos IgG sugestiva de uma imunidade sistêmica.

- houve pela via intranasal indução de anticorpos direcionados principalmente para proteínas da classe 1, 2, 5, 50kDa, e acima de 50kDa; proteínas consideradas importantes no combate da infecção meningocócica. Anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados com OMC das cepas com maior expressão dos LPS dos imunotipos L3,7,9 e L8 reconheceram também peptídeos de outras cepas de *N. meningitidis* (B:4:P1.9, B:4:NT, B:14:NT e C:2a.P1.2), principalmente para proteínas de alto peso (acima de 50 kDa). Não houve diferenças entre os títulos de anticorpos imunizados com L3,7,9 e L8 sugerindo que a expressão de diferentes imunotipos não afetou a indução de anticorpos.

CONCLUSÃO

- houve persistência dos anticorpos induzidos pelas preparações antigênicas administradas pela via intranasal. No estudo utilizando o soro e a saliva (de camundongos imunizados pela via intranasal) obtidos 1 ano após a imunização pela via intranasal, observamos pelos títulos de anticorpos dos isótipos IgG e IgA a persistência dos anticorpos na saliva e no soro, indicativo de que a preparação vacinal com OMC das cepas selecionadas foi capaz de induzir células de memória imunológica tanto sistêmica como de mucosa.

- os anticorpos induzidos apresentaram atividade bactericida. Altos títulos bactericidas puderam ser detectados no soro de camundongos imunizados pela via intranasal e intramuscular, indicando que estes podem ser efetivos no combate para o meningococo. Contudo não verificamos diferenças entre os imunizados com cepas com maior ou menor expressão dos imunotipos L3,7,9 e L8.

Estes dados sugerem que a seleção de LPS não afeta a capacidade das preparações de OMC em induzir anticorpos com capacidade bactericidas nem altera os títulos de anticorpos obtidos na imunização. Entretanto diferenças importantes na especificidade dos anticorpos a antígenos distintos da *N. meningitidis* B. Esta diferença na especificidade indicam que a seleção ser muito importante para o desenvolvimento de uma vacina contra a *N. meningitidis* B.

VII- Referências Bibliográficas

- ABDILLAH, H., POOLMAN, J.T. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in "whole-cells" ELISA. **Microb. Pathog.**, Sidcup, v.1, p.27-32, 1988.
- ALA' ALDEEN D.A. Transferrin receptors of *Neisseria meningitidis*: promising candidates for a broadly cross-protective vaccine. **J. Med. Microbiol.**, Hagerstown, v.44, n.4, p.237-243, 1996.
- ALKIMIN, M.G.A., CUSTÓDIO, A.V., ARAÚJO, T.P., SALGADO, M.M. Immunoepidemiological study of bacterial meningitis in São Paulo. In: IV Encontro do Instituto Adolfo Lutz - Encontro Nacional dos Laboratórios de Saúde Pública, 15 a 18 de outubro, São Paulo, 2001. **Abstract**. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Secretaria de Estado da Saúde), São Paulo, v.60, supl.1, Winner Graph, novembro 2001, IMU4, p.120.
- ANDERSEN, S.R., BJUNE, G., HØIBY, E.A., MICHAELSEN, T.A., AASE, A., RYE, U., JANTZEN, E. Outer membrane vesicle vaccines made from short-chain lipopolysaccharide mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*: effects of the carbohydrate chain length on the immune response. **Vaccine**, Amsterdam, v.16, p.1225-1234, 1997.
- BAKKE, H., LIE, K., HAUGEN, I.L., KORSVOLD, G.E., HØIBY, E.A., NAESS, L.M., HOLST, J., AABERGE, I.S., OFTUNG, F., HANEBERG, B. meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster response without evidence of tolerance. **Infect. immun.**, Washington, v.69, n.8, p.5010-5015, 2001.

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2001.

- BAQAR, S., BOURGEOIS, A.L., APPLEBEE, L.A., MOURAD, A.S., KLINOSKY, M.T., MOHRAN, Z., MURPHY, J.R. Murine intranasal challenge model for the study of *Campylobacter* pathogenesis and immunity. *Infect. Immun.*, Washington, v.56, n.8, p.4933-4939, 1996.
- BELO, E.F.T., DE GASPARI, E.N. Produção e caracterização de dois novos anticorpos monoclonais para imunotipos de LPS importantes na seleção de cepas para o preparo de vacinas de *N. meningitidis* B. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.60, supl.1, p.109, 2001.
- BHASIN, N., HO, YU, WETZLER, L.M. *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharide modulates the specific humoral immune response to Neisserial porins but no effect on Porin-Induced Upregulation of Costimulatory Ligand B7-2. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, n.8, p.5031-5036, 2001.
- BHATTACHARJEE, A.K., MORAN, E.E., ZOLLINGER, W.D. Antibodies to meningococcal H.8 (Lip) antigen fail to show bactericidal activity. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v.36, p.117-122, 1989.
- BIENESTOCK, J., ERNST, P.B., UNDERDOWN, B.J. The gastrointestinal tract as an immunologic organ - state of art. *Ann. Allergy*, Minneapolis, v.59, n.2, p.17-20, 1987.
- BJUNE, G., HØIBY, E.A., GRONNESBY, J.K. Effect of outer membrane vesicle against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet*, London, v.338, p.1093-1096, 1991.
- BOLESGO, J., GARCIA, J., CRUZ, C., ZOLLINGER, W.D., BRANDT, B., RUIZ, S., MARTINEZ, M., ARTHUR, J., UNDERSTOOD, P., SILVA, W., MORAN, E., HANKINS, W., GILLY, J., MAYS, J., THE CHILEAN NATIONAL COMMITTEE FOR MENINGOCOCCAL DISEASE. Efficacy, safety and immunogenicity of a meningococcal group B:15:P1.3 outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. *Vaccine*, Amsterdam, v.13, p.821-829, 1995.
- BOS, J.M., RÜMKE, H.C., WELTE, R., POSTMA, M.J., JAGER, J.C. Health economics of a hexavalent meningococcal outer-membrane vesicle vaccine
-

- in children: potential impact of introduction in the Dutch vaccination program. **Vaccine**, Amsterdam, v.20, p.202-207, 2002.
- BRANDILEONE, M.C., ZANELLA, R.C., VIEIRA, V.S., SACCHI, C.T., MILAGRES, L.G., FRASCH, C.E. Induction of iron regulated proteins during normal growth of *Neisseria meningitidis* in a chemically defined médium. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.36, n.4, p.301-310, 1994.
- BRANDTZAEG, P. Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, suppl.1, p.5167-5176, 1992.
- BRANDTZAEG, P., BJERKE, K., KETT, K., KVALE, D., ROGNUM, T.O., SCOTT, H., SOLLID, L.M., VALNES, K. Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. **Ann. Allergy**, Mt Lean, v.59 (3pt2), p.21-39, 1987.
- BURGIO, G.R., LANZAVECCHIA, A., PLEBANI, A., JAYAKAR, S., UGAZIO, A.G. Ontogeny of secretory immunity; levels of secretory IgA and natural antibodies in saliva. **Pediatr. Res.**, Baltimore, v.14, n.10, p.1111-1114, 1980.
- CARTWRIGHT, K. MORRIS R., RUMKE, H, FOX, A. BORROW, R., BEGG, N., RICHMOND, P. POOLMAN J.T. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (Por A) outer membrane proteins. **Vaccine**, Amsterdam, v.17, p.2612-2619, 1999.
- CLAASSEN, M., VAN DER LEY, P.J., PEETERS, C., BRONS, H., ROBERT, J., BORSBOOM, P., VAN DER ARK, A., VAN STRAADEN, I., ROHOLL, P., KUIPERS, B., POOLMAN, J.. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v.14, n.10, p.1001-1008, 1996.
- CONLEY, M.E., DELACROIX, D.L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? **An. Intern. Med.**, Philadelphia, v.106, n.6, p.892-899, 1987.
-

- COSSIÓ, M.E.F., OHLIN, M., LLANO, M., SELANDER, B., CRUZ, S., DEL VALE, J., BORREBAECK, C.A.K. Human monoclonal antibodies against an epitope on the class 5c outer Membrane protein comon to many pathogenic strains of *Neisseria meningitidis*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.166, p.1322-1328, 1992.
- CRIPPS, A.W., KYD, J.M.A., FOXWELL, A.R. Vaccines and mucosal immunization. **Vaccine**, Amsterdam, v.19, n.17/19, p.2513-2515, 2001.
- DANELLI, M.G.M., ALVES, C.M.A., BASTOS, R.C., BATOREU, N.M., BARROSO, D.E., PERALTA, J.M., FRASCH, C.E. Human immune response to epitopes on the meningococcal outer membrane class 5 protein following natural infection. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.15, p.159-160, 1996.
- DAVIES, R.L., WALL, R.A., BORRIELLO, S.P. Comparison of methods for the analysis of outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* by Western blotting. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.134, p.215-225, 1990.
- DE GASPARI, E.N., RIBEIRO-FILHO, A.A., BACCOCINI, C.N., ZOLLINGER, W.D. The use of filter paper monoclonal antibodies in a Dot-blot test for typing *Neisseria meningitidis* B. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.27, p.2889-2893, 1994.
- DE GASPARI, E.N. A new monoclonal antibody against outer membrane complex (50KD) of *Neisseria meningitidis* modify the course of bacteremia in a mouse model. **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.96, p.63-71, 1995.
- DE GASPARI, E.N. Detection of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid from suspicious cases of meningococcal meningitis using polymerases chain reaction and counterimmunoelectrophoresis. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v.32, n.2, p.97-103, 2000a.
- DE GASPARI, E.N. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with

- different bacterial genera. *Hybridoma*, Larchmont, v.19, n.6, p.445-453, 2000b.
- DE GASPARI, E.N. Uma visão retrospectiva das principais vacinas para *Neisseria meningitidis* B. *LAES HAES*, São Paulo, v.122, p.130-154, 2000c.
- DE GASPARI, E.N., ZOLINGER, W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. *Braz. J. Infect. Dis.*, Salvador, v.5, n.3, p.143-153, 2001.
- DE KLEIJN, E.D., DE GROOT, R., LAFEBER, A.B., LABADIE, J., VAN LIMPT, K.C., VISSER, J., BERBERS, G.A., VAN ALPHEN, L., RUMKE, H.C. Prevention of meningococcal serogroup B infections in children: a protein-based vaccine induces immunologic memory. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.184, n.1, p.98-102, 2001.
- DE KLEIJN, E.D., DE GROOT, R., LABADIE, J., VAN LIMPT, K.C., VISSER, J., BERBERS, G.A., VAN ALPHEN, L., RUMKE, H.C. Immunogenicity and safety of a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine in children of 2-3 and 7-8 years of age. *Vaccine*, Amsterdam, v.18, n.15, p.1456-1466, 2002.
- DE VOE, I.W. The meningococcus and the mechanisms of pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.46, n.2, p.162-190, 1982.
- DEVI, S.J., SCHNEERSON, R.W., VANN, W.F., ROBBINS, J.B., SHILOACH, J. Identity between polysaccharide antigens of *Moraxella nonliquefaciens*, Group B *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli* K1 (non-o-acetylated). *Infect. Immun.*, Washington, v.59, n.2, p.732-736, 1991.
- DIAZ, R.J., OUTSHOORN, I.M. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.7, n.4, p.559-575, 1994.
- DIXON, G.L., NEWTON, P.J., CHAIN, B.M., KATZ, D., ANDERSEN, S.R., WONG, S., VAN DER LEY, P., KLEIN, N., CALLARD, R.E. Dendritic cell

- activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin – 12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, n.7, p.4351-4357, 2001.
- DRABICK, B., ZOLLINGER, W. Safety and immunogenicity testing of an intranasal group B meningococcal native outer membrane vesicle vaccine in healthy volunteers. *Vaccine*, Amsterdam, v.18, p.160-172, 2000.
- EISENSTEIN, T.K., DEAKINS, L.W., SULTZER, B.M, KILLAR, L., SALUK, P.H., SULTZER, B.M.. Dissociation of innate susceptibility to *Salmonella* infection and endotoxin responsiveness in C3HeB/FeJ mice and other strains in the C3H lineage. *Infect. Immun.*, Washington, v.36, n.2, p.696-703, 1982.
- ESTABROOK, M.M., GRIFFISS, J.M., GARVIS, G.A. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect. Immun.*, Washington, v.16, p.105-115, 1997.
- FRANK, M.M., JOINER, K., HAMMER, C. The function of antibody in the lysis of bacteria. *Rev. Infect. Disease*, Chicago, v.9, p.S537-S545, 1987.
- 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.*, Chicago, v.7, p.504-510, 1995.
- FUNASA - MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Doença meningocócica..." Disponível em <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em 15 ago. 2001.
- GOLDSCHNEIDER, I., GOTSCHLICH, E.C., ARTENSTEIN, M.S. Human immunity to the meningococcus. 1. Development of natural Immunity: the role of antibodies. *J. Exp. Med.*, New York, v.129, p.1327-1347, 1969.
- GRIFFISS, J. M., SCHNEIDER, H., MANDRELL, R.E., YAMASAKI, R. JARVIS, G.A., GIBSON, B.W., HAMDEH, R., APICELLA, M.A. Lipooligosaccharides: the principal glycolipids of the neisserial outer membrane *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.10, suppl.2, S287-S295, 1982.
-

- GRIFFISS, J.M., SCHNEIDER, H., MANDRELL, R.E., JARVIS, G.A., KIM, J.J., GIBSON, B.W., APICELLA, M.A. The immunochemistry of neisserial LOS. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.53, p.501-507, 1987.
- HAMELLERS, D.M., STOOP, A.E., VAN DER VEN, I., BIEWENGA, J., VAN DER BAAN, S., SMINIA, T. Intra-epithelial lymphocytes and non-lymphoid cells in the human nasal mucosa. *Inst. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, Basel, v.88, n.3, p.317-322, 1989.
- HAMMERSCHMIDT, S., MULLER, A., SILLMANN, H., MUHLENKOFF, M., BORROW, R., FOX, A., VAN PUTTEN, J., ZOLLINGER, W.D., GERARDY-SCHAHN, R., FROSCH, M. Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polytransferase gene (Sia D): correlation with bacterial invasion and outbreak of meningococcal disease. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.20, n.6, p.1211-1220, 1996.
- HANEBERG, B., KENDALL, D., AMERONGEN, H.M., APTER, F.M., KRAEHENBUHL, J.P., NEUTRA, M.R. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.*, Washington, v.62, n.1, p.15-23, 1994.
- HANEBERG, B., PLASEG, R., WEDEGE, E., HØIBY, E.A., HAUGEN, I.L., OFTUNG, F., ANDERSEN, S.R., NAES, L.M., AASE, A., MICHAELSEN, T.E., HOEST, J.. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces resistant local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. *Infect. Immun.*, Washington, v.66, p.1334-1341, 1998.
- HANSON, L.A., BRANDTZAEG, P. The mucosal defense system: immunological disorder in infants and children. In: Stiehm, E. R., ed. 3^a ed., Philadelphia: WB. Saunders, 1989, p.116-155.
- HANSON, L.A., ASHRAF, R., CARLSSON, B., JALIL, F., KARLBER, G.J., LINDBLAND, B.S., KHANSR, ZAMAN, S. Save the children. In: Peace health

- and development ed., L. A. Haanson & kohler, University of Göteborg & the Nordic school of public Health, N.H.V. Report, 1993, v.4, p.31-52.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. WILLIAMS, S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins ed., Baltimore, p. 91 149, 1994.
- HUSBAND, A.J. Novel vaccination strategies for the control of mucosal infection. *Vaccine*, London, v.11, n.2, p.107-112, 1993.
- JENNINGS, H.J., BEURET, M., GAMIAN, A., MICHON, F. Structure and immunochemistry of meningococcal lipopolisaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.53, p.519-522, 1987a.
- JENNINGS, H.J., GAMIAN, A., ASHTON, F.E. N-propionylated group B meningococcal polysaccharide mimics a unique epitope on group B neisseria meningitidis. *J. Exp. Med.*, New York, v.165, n.4, p.1207-1211, 1987b.
- JENNINGS, M.P., SRIKHANTA, Y.N., MOXON, E.R, KRAMER, M., POOLMAN, J.T., KUIPERS, B., VAN DER LEY, P. The genetics basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, Reading, v.145, p.3013-3021, 1999.
- JERSE, A.E., REST, R.F. Adhesion and Invasion by the pathogenic Neisseria. *Trends Microbiol.*, Cambridge, v.5 (pt 11), p.217-221, 1997.
- JOLLEY, K.A., APPLEBY, L., WRIGHT, J.C., CHIRSTODOULIDES, M., HECKELS, J.E. Immunization with recombinant Opc (outer membrane protein) from *Neisseria meningitidis*: influence of sequence variation and levels of expression on the bactericidal immune response against meningococci. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, n.6, p. 3809-3816, 2001.
- JONES D.M., BORROW, R., FOS, A.J., GRAY, S., CARTWRIGHT, K.A., POOLMAN, J.T. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb. Pathog.*, Sidcup, v.13, p.219-224, 1992.

- KAGNOFF, M.F., MURAY, P.D. T-dependent induction of an IgA and IgM anti-polysaccharide response. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v.216A, p.155-167, 1987.
- 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 membrane vesicle vaccine. **Infect. Immun.**, Washington, v.70, n.2, p.702-707, 2002.
- KAWANISHI, H., STROBER, W. T-cell regulation of IgA immunoglobulin production in gut-associated lymphoid tissues. **Mol. Immunol.**, Amsterdam, v.20, n.9, p.917-930, 1983.
- KOORNSTRA, P.J., DUIJVESTIJN, A.M., VLEK, L.F., MARRES, E.H., VAN BREDA VRIESMAN, P.J. Tonsillar (Waldeyer's ring equivalent) lymphoid tissue in the rat: lymphocyte subset binding to high endothelial venules (HEV) and "*in situ*" distribution. **Res. Immunol.**, New York, v.4, n.6, p.401-408, 1992.
- KUPER, C.F., KOOMSTRA, P.J., HAMELEERS, D.M., BIEWENGA, J., SPIT, B.J., DUIJVESTIJN, A.M., VAN BREDA VRIESMAN, P.J., SMINIA, T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. **Immunol. Today**, Oxford, v.13, n.6, p. 219-224, 1992.
- LADJEVA, I., PETERMAN, J.H., MESTECKY, J. IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.78, n.1, p.85-90, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LAW, B.J., ROSENBERG, T., MAC DONALD, N.E., ASHTON, F.E., HUANG, J.E., KING, W.J., FEMIS, W.J., GRAY, G.J. Age-related immunogenicity of meningococcal polysaccharide vaccine in aboriginal children and adolescents living in a northern Manitoba reserve community. **Pediatr. Infect. Dis.**, Baltimore, v.17, n.10, p.860-864, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MAC GHEE, J.R., MICHALEK, S.M., MERGENHAGEN, S.E., ROSENSTREICH, D.L. Cellular requirements for lipopolysaccharide adjuvant activity. A role for both T lymphocytes and macrophages for "in vitro" responses to particulate antigens. *J. Exp. Med.*, New York, v.79, n.4, p.793-807, 1979.
- MAC NABB, P.C., TOMASI, T.B. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v.35, p.477-496, 1981.
- MACKINNON, F., BORROW, R., GORRINGE, A.R., FOX, A.J., JONES, D.M., ROBINSON, A. Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb. Pathog.*, Sidcup, v.15, p.359-366, 1993.
- MASLANKA, S.E., GHEESLING, L.L., LIBUTTI, D.E., DONALDSON, K.B.J., HARAKEH, H.S., DYKUS, J.K., ARHIN, F.F., DEVI, S.J.N., FRASCH, C.E., HUANG, J.C., KRIZ-KUZEMENSKA, P., LEMMON, R.D., LORANGE, M., PEETERS, C.C.A.M., QUATAERT, S., TAI, J.Y., CARLONE, G.M. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v.4, p.156-167, 1997.
- MANDRELL, R.E., ZOLLINGER, W.D. Human Immune response to meningococcal outer membrane protein epitopes after natural infection and vaccination. *Infect. Immun.*, Washington, v.57, n.5, p.1590-1598, 1989.
- MARTIN, D., CADIEUX, N., HAMEL, J., BRODEUR, B.R. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J. Exp. Med.*, New York, v.185, n.7, p.1173-1183, 1997.
- MEYER T.F., POHMER, J., VAN PUTTEN, J.P. Biology of the pathogenic *Neisseriae*. *Curr. Top. Microb. Immunol.*, Berlin, v.192, p.283-316, 1994.
- MELANCON, J., MURGITA, R.A., DE VOE, I.W. Activation of murine B lymphocytes by *Neisseria meningitidis* and isolated meningococcal surface antigens. *Infect. Immun.*, Washington, v.42, n.2, p.471-479, 1983.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MELLES, C.E., RAMIRES, M.R., DINIZ, J.M., ADELINO, M.G., TAUNAY, A.E., ROSSI, C.V. Comparative study of diagnostic methods in purulents meningitis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.20, n.4, p.202-207, 1978.
- MESTECKY, J., MC GHEE, J.R., CRAGO, S.S., JACKSON, S., KILIAN, M., KIYONO, H., BABB, J.L., MICHALEK, S.M. Molecular and cellular interactions in the secretory IgA response. **J. Reticuloendothel. Soc.**, New York, suppl.28, p.455-505, 1980.
- MESTECKY, J., MC GHEE, J.R. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular Interactions Involved in IgA biosynthesis and immune response. **Adv. Immunol.**, San Diego, v.40, p.153-245, 1987.
- MICHAELSEN, T.E., AASE, A., KOLBERG, J., WEDEGE, E., ROSENQVIST, E. Por B3 outer membrane protein on *Neisseria meningitidis* is poorly acessible for antibody biding on live bacteria. **Vaccine**, Amsterdam, v.19, p.1526-1533, 2001.
- MILAGRES, L.G., BRANDILEONE, M.C.C., FRASCH, C.E. Antibody studies in mice of outer membrane antigens for use in an improved meningococccal B and C vaccine. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam v.13, p.9-17, 1996.
- MILAGRES, L.G., RAMOS, S.R., SACCHI, C.T., MELLES, C.E.A., VIEIRA, V.S.D., SATO, H., BRITTO, G.S., MORAES, J.C., FRASCH, C.E. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, n.10, p.4419-4424, 1994.
- MOE, G.R., ZUNO-MITCHELL, P., LU, S.S., LUCAS, A.H., GRANOFF, D.M. Functional activity of anti-neisserial surface protein A monoclonal antibodies against strains of *Neisseria meningitidis* serogroup B. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, n.6, p.3762-3771, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MOLDOVEANU, Z., RUSSELL, M.W., WU, H.Y., HUANG, W.Q., COMPANS, R.W., MESTECKY, J. Compartmentalization within the common mucosal system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v.371A, p.97-101, 1995.
- MORAN, E.E., BRANDT, B.L., ZOLLINGER, W.D. Expression of the L8 Lipopolysaccharide determinant increase the sensivity of *Neisseria meningitidis* to serum bactericidal activity. *Infect. Immun.*, Washington, v.62, n.12, p.5290-5295, 1994.
- MORLEY, S.L., POLLARD, A.J. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine*, Amsterdam, v.20, p.666-687, 2002.
- NICHOLSON, A., LEPOW, I.H. Host defense against *Neisseria meningitidis* disease requires a complement-dependent bactericidal activity. *Science*, New York, v.205, p.298-299, 1979.
- OFEK, I., BEACHEY, E.H., EYAL, F., MORRISON, J.C. Postnatal development of biding of streptococci and lipoteichoic acid by oral mucosal cells of humans. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.135, n.2, p.267-274, 1977.
- OGRA, P.L. Global eradication of poliomyelites: reinvent the wheel or use existing options effectively? *Public. Health. Rev.*, Telaviv, v.21, n1-2, p.143-150, 1983.
- PARMELY, M.J., BEER, A.E. Colostral cell-mediated immunity and the concept of a common secretory immune system. *J. Dairy Sci.*, Lancaster, v.60, n.4, p.655-665, 1977.
- PELTOLA, H. Meningococcal disease: still with us. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.5, p.71-91, 1993.
- PELTOLA, H. Meningococcal vaccines: currents status and future possibilities. *Drugs*, Auckland, v.55, n.3, 1998.
- PINTOR, M., FERRON, L., GOMEZ, J.A., POWELL, N.B., ALA' ALDEEN, D.A., BORRIEDO, S.P., CRIADO, M.T., FERREIRÓS, C.M. Blocking of Iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microb. Pathog.*, cidade de São Paulo, v.20, n.3, p.127-139, 1996.
-

- PIZZA, M., TAPPERO, J.W., LAGOS, R., BALLESTEROS, A.M., PLIKAYTI, B., WILLIAM, D., PYKIS, J., GEESLING, L.L., CARLONE, G.M., HØIBY, E.A., HOLST, J., NØKLEBY, H., RESNØQVIST, E., SIERRA, G., CAMPA, G., SOTOLONGO, F., VEGA, J., GARCIA, J., HERRERA, P., POOLMAN, J.T., PERKINS, B.A.. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, Washington, v.287, p.1816-1820, 2000.
- POLLARD, A.J., LEVIN, M. Vaccines for prevention of meningococcal disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Baltimore, v.19, n.4, 2000.
- POLLARD, A.J., FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, Amsterdam, v.19, p.1327-1346, 2001.
- POOLMAN, J.T. Development of a meningococcal vaccine. *Infect. Agents. Dis.*, Washington, v.4, p.13-28, 1995.
- POOLMAN, J.T. TIMMERMANS, H.A., HOPMAN, C.T., TEERLINK, T., VAN VUGHT, P.A., WITVLIET, M.H., BEUVERY, E.C. Comparison of meningococcal outer membrane vaccines solubilized with detergent or C polissacharide. *Antonie Van Leeuwenhoek*, London, v.53, p.413-419, 1987.
- POOLMAN, J.T., HOPMAN, C.T.P., ZANEN, H.C. Problems in the definition of meningococcal serotypes. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.13, p.339-348, 1982.
- QUIDING-JARBRINK, LAKEW, M., NORDSTROM, I., BANCHEREAU, J., BUTCHER, E., HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C. Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunization: differential homing commitments and cell surface differentiation markers. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v.25, n.2, p. 322-327, 1995.
- RAFF, H.V., DEVEREUX, D., SHERFORD, W., ABBOTT-BROWN, D., MALONEY, G. Human monoclonal antibody with protective activity for *Escherichia coli* k1 and *Neisseria meningitidis* group B infection. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.157, n.1, 1988.
-

- Ministerio de Hacienda y Fomento

- of *Streptococcus mutans* coupled to the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.*, Washington, v.59, n.11, p.4061-4070, 1991.
- SACCHI, C.T., DE LEMOS, A.P., CAMARGO, M.C., WHITNEY, A.M., MELLES, C.E., SOLARI, C.A., FRASCH, C.E., MAYER, L.W. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype in São Paulo, Brazil, 1990 to 1996. *Rev. Inst. med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.40, n.2, p.65-70, 1998.
- SAUNDERS, N.B., SHOEMAKER, D.R., ZOLLINGER, W.D., BRANDT, B.L., MORAN, E.E., RARSEN, T. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicle in mice. *Infect. Immun.*, Washington, v.67, n.1, p.113-119, 1999.
- SCHOLTEN, R.J., POOLMAN, J.T., VALKENBURG, H.A., BIJLMER, H.A., DANKERT, J., CAUGANT, D.A. Phenotypic and genotypic changes in a new clone complex of *Neisseria meningitidis* causing disease in the Netherlands, 1958-1990. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.69, n.3, p.673-676, 1994.
- SIERRA, V.G.G., CAMPA, C.H., GARCIA, L.I., SOTOLONGO, F.P., IZQUIERDO, L.P., VALCARCEL, M.M., CASANUEVA, V.G., BARÓ, M.S., LEGREN, F.C., RODRÍGUEZ, R.C., TERRY, H.M. Efficacy evaluation of the cuban vaccine VA-MENGOC- BC® against disease caused by serogroup B *Neisseria meningitidis*. In: *Neisseria*. ed. Atchman, Berlin, Walter de Gruyter, 1990, p.129-134.
- STEEGHS L., KUIPERS, B., HAMSTRA, J., HENDRIK, J., KERSTEN, G., VAN ALPHEN, L., VAN DER LEY, P. Immunogenicity of outer membrane proteins in a Lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect. Immun.*, Washington, v.67, n.10, p.4988-4993, 1999.
- STEPHENS, D.S., WHITNEY, A.M., MELLY, M.A., HOFFMAN, L.H., FARLEY, M.M., FRASCH, C.E. Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, Washington, v.51, n.2, p.579-585, 1986.
-

- STEPHENS, D.S., FARLEY, M.M. Pathogenic effects during infection of the human nasopharynx with *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v.13, p.22-33, 1991.
- STEPHENS, D.S. Uncloning the meningococcus dynamics of carriage and disease. *Lancet*, London, v.353, p.941-942, 1999.
- STROBER, W., JAMES, S.P. the mucosal immune system. In: Stites, D.P., Terr, A.I. **Basic and clinical Immunology**. 7^aed., California: Appleten & Lange, 1991 p.175-185.
- TAPPERO, J.W. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.281, n.16, p.1520-1527, 1999.
- TETTELIN, H., SAUNDERS, M.J., HILDEBERG, J., JEFFREIES, A.C., NELSON, K.E., EISEN, J.A, KITCHUN, K.A., HOOD, D.W., PEDEN, J.F., DODSON, R.J., NELSON, W.C., GWINM, M.L., DEBOY, R., PETERSON, J.D., HICKEY, E.K., HAFT, D.H., SALZBERG, S.L., WHITE, O., FLEISCHMANN, D., MASON, T., CIECHO, A., PARKSEY, D.S., BLAIR, E., CITTONI, H., CLARK, E.B., COTON, M.D., UTTERBACK, T.R., KHOURI, H., QIN, H., VNATHERAN, J., GILL, J., SCARLATHO, V., MASIGNANI, V., PIZZA, M., GRANDI, G., SMITH, H.O., FRASER, C.M., MOXON, E.K., RAPPOULI, R., VERTER, J.C. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, New York, v.287, p.1809-1815, 2000.
- TOMASI, T.B., PLAUT, A.G. Humoral aspects of mucosal immunity. In: Gallin, J., Fauci, A. eds. **Advances in host defense mechanism - mucosal immunity**. New York: Rowen Press, 1985 v.4, p.45-52.
- TOWBIN, H., STACHEKIN, T., GORDON, J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v.76, p.4350-4354, 1979.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TRONCOSO, G. SANCHEZ, S., MOREDA, M., FERREIRÓS, C.M. Antigenic cross reactivity between outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. **FEMS Med. Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.27, n.2, p.103-109, 2000.
- TSAI, C.M., FRASCH, C.E., MOCCA, L.F. Five structural classes of major outer membrane protein in *Neisseria meningitidis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.146, n.1, p.69-78, 1981.
- TSAI, C.M., FRASCH, C.E. A sensitive stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrilamide gels. **Anal. Biochem.**, New York, v.119, n.1, 115-119, 1982.
- TSANG, R.S., LAW, D.K., TSAI, C.M., NG, L. Detection of the 1st gene in different serogroups and LOS immunotypes of *Neisseria meningitidis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.199, n.2, p.203-206, 2001.
- TZENG, Y.-L., STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*: microbes and Infection, Amsterdam, v.2, p.687-700, 2000.
- VAERMAN, J.P. The secretory immune system. **Antibiot. Chemother.**, Washington, v.39, p.41-50, 1987.
- VAN DER LEY, P., STEEGHS, L., HAMSTRA, H.J., HOVE, J.T., ZOMER, B., ALPHEN, L.V. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxI mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity and adjuvant activity. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, n.10, p.5981-5990, 2001.
- VAN DER VOORT, E.R., SCHULLER, M., HOLST, J., DE VRIES, P., VAN DER LEY, P., DOBBELSTEEN, G., POOLMAN, J.T. Immunogenicity studies with a genetically engineered hexavalent Por A and a wild-type meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine in infant cynomolgus monkeys. **Vaccine**, Amsterdam, v.18, p.1334-1343, 2000.
- VAN PUTTEN, J.P. Iron acquisition and the pathogenesis of meningococcal and gonococcal disease. **J. Med. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v.179, n.6, p.289-295, 1995.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- VERHEUL, A.F.M., SNIPPE, H., POOLMAN, J.T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component." *Microbiol. Rev.*, Washington, v.57, n.1, p.34-49, 1993.
- VIDARSON, G., POL, W.L., VAN DER ELSEN, J.M.H., VILÉ, H., JANSEN, M., RUJIS, J., MORTON, H.C., BOEL, E., DAHA, M.R., CORTHESEY, B., DER WINKEL, J.G.L. Activity of human IgG and IgA subclasses in Immune defense against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J. Immunol.*, Bethesda, v.166, p.6251-6252, 2001.
- VIRJI, M., PEAK, I.R.A., MAKPEACE, K., JENNINGS, M.P., FERGUSON, D.J.P., MOXON, E.R. Opc and pillus -dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.18, p.741-754, 1995.
- WIERS, E.J., DELVIG, A., DONDEERS, E.M., BRUGGLEe, H.F, VAN UNEN, L.M., TIMMERMAM, H.A., ACHTMAN, M., HOOGENHOUT, P., POOLMAN, J.T. T-cell responses to outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: comparative study of the OpA, OpC and Por A proteins. *Infect. Immun.*, Washington, v.64, n.1, p.298-304, 1996.
- WOLD, A.E., MESTECKY, J., TOMANA, M., KOBATA, A., OHBAYASHI, H., ENDO, T., EDEN, C.S. Secretory immunoglobulin A carriers oligosaccharide receptors for *Scherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.*, Washington, v.58, n.9, p.3073-3077, 1990.
- WOODS, J.P., OHO, E.L., BARRITT, D.S., BLACK, J.R., CONNELL, T.D., KAWULA, T.H., SPINOLA, S.M., CANNON, J.G. the H8 antigen of pathogenic *Neisseriae*. *Antonie van Leewenhoek*, Amsterdam, v.53, p.533-536, 1987.
- WU, H.Y., RUSSELL, M.W. induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subnit. *Infect. Immun.*, Washington, v.61, n.1, p.314-322, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WU, H.Y., RUSSELL, M.W. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune systems. **Immunol. Res.**, Totowa, v.16, suppl.2, p.182-201, 1997.
- ZOLLINGER, W.D., MORAN, J.E.E., MCCLAIN, B. Phase I safety and immunogenicity study of a meningococcal outer membrane protein detoxified LPS vaccine. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM, HANASAARI, EXPO, Finland, Abstracts; Ed Front. Vac. Res.**, 1991b.
- ZOLLINGER, W.D., MANDRELL, R.E. Importance of complement source in bactericidal activity of human antibody and murine monoclonal antibody to meningococcal group B polysaccharide. **Infect. Immun.**, Washington, v.40, n.1, p.257-264, 1983.
- ZOLLINGER, W.D., MORAN, J.E.E. Meningococcal vaccines: present and future. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.85, suppl.1, p.37-48, 1991a.