



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANILO ANTONINI ALVES

**“UTILIZAÇÃO DE SÍLICA MESOPOROSA COMO
ADJUVANTE EM VACINAS DE VESÍCULA DE
MEMBRANA EXTERNA DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniilo Antonini Alves
Marcelo Lancellotti
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre em
Biologia Funcional e Molecular,
na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

AL87u	<p>Alves, Danilo Antonini, 1987- Utilização de sílica mesoporosa como adjuvante em vacinas de vesícula de membrana externa de <i>Neisseria meningitidis</i> / Danilo Antonini Alves. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Marcelo Lancellotti. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Neisseria meningitidis</i>. 2. Vacinas bacterianas. 3. Nanopartículas. 4. Adjuvantes farmacêuticos. 5. Meningite bacteriana. I. Lancellotti, Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Application of mesoporous silica as a vaccine adjuvant in the outer membrane vesicles vaccination of *Neisseria meningitidis*

Palavras-chave em Inglês:

Neisseria meningitidis

Bacterial vaccines

Nanoparticles

Pharmaceutical adjuvants

Bacterial meningitis

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Lancellotti [Orientador]

Daniele Ribeiro de Araújo

Wanda Pereira Almeida

Data da defesa: 06-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 06 de fevereiro de 2012

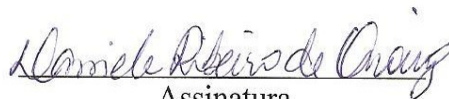
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo



Assinatura

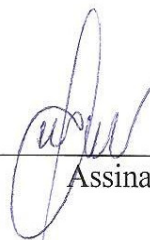
Profa. Dra. Elen Landgraf Guiguer

Assinatura

Prof. Dr. Cleyton Crepaldi Domingues

Assinatura

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida



Assinatura

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Umbelino e Audaci e aos meus irmãos Thiago e Diego.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Marcelo Lancellotti* pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa por ele coordenado. Agradeço também pela orientação, amizade, dedicação, profissionalismo e paciência.

À Profa. Dra. *Luciana Maria de Hollanda* pelos conselhos científicos e não científicos, pela amizade e companheirismo.

À Profa. Dra. *Daniele Ribeiro de Araújo* por ter aceitado participar da minha banca de qualificação e da defesa da minha dissertação.

À Profa. Dra. *Elen Landgraf Guiguer* por ter me inserido e incentivado a conhecer o mundo científico, pelos ensinamentos proporcionados durante toda minha graduação e principalmente pela amizade. Agradeço também pelo aceite em participar como membro suplente da banca de qualificação deste trabalho.

À Profa. *Wanda Pereira Almeida* por aceitar participar da minha banca da dissertação;

Ao Prof. Dr. *Cleyton Crepaldi Domingues* por ter aceito participar como membro suplente da banca de defesa da dissertação.

Aos Profs. Drs. *Sérgio Marangoni e Leonilda Maria Barbosa dos Santos* por terem aceitado participar da minha banca de qualificação. Agradeço também as Profas. Dras. *Cíntia Maria Saia Cereda e Patrícia Moriel* por terem aceitado a suplência da banca de qualificação deste trabalho.

Aos meus amigos de LABIOTEC, à *Fernanda Fabian, Daniel Ferreira, Paulo André e Flávia Luna* que não estão mais presente diariamente em nosso grupo, mas, deixaram

marcas positivas que jamais serão apagadas em mim e em nosso laboratório. Aos membros atuais, *Alice Tavares do Reis* pela amizade, conselhos acadêmicos e por ser um exemplo de perseverança e superação. À *Cecília Amstalden* pelo companheirismo, amizade, conselhos e por seu bom humor diário que sempre torna nosso ambiente mais alegre. À *Gisele Cristiane Gentile Cury* pelo exemplo de dedicação e postura laboratorial e pela amizade. Ao *Ives Bernardelli de Mattos* pelos ensinamentos, companheirismo, pela ajuda na finalização dos meus experimentos e amizade compartilhada dentro e fora do laboratório. A *Júlia Nogueira Varela* pela amizade, incentivo, motivação e por toda ajuda proporcionada dentro e fora do laboratório. Ao *Mario Sérvulo Izidoro Júnior* pelo companheirismo, conselhos, amizade, companhia nas alimentações saudáveis e principalmente não saudáveis e por toda ajuda na realização deste trabalho. À *Renan Kosseki Jacinto* pela ajuda, companheirismo, amizade e incentivo para a realização deste trabalho. E especialmente à *Rafaella Fabiana Carneiro Pereira* pela amizade, companheirismo, motivação, paciência, dedicação, auxílio, conselhos científicos e não científicos, pela companhia em nossas idas ao laboratório nos finais de semana e em todos os outros eventos cotidianos. Aos novos membros laboratoriais *Cibele Zardini Esteves e Ana Carolina Afonso*, e aos membros que passaram em nosso laboratório de forma temporária *Davi Santi, Rodolfo Boer, Camila Bortoletto, Kléber Almeida e Aline Kuhl*.

Aos maiores presentes que ganhei da cidade de Campinas, meus amigos *Danielle Maria Silva Yahn* pela amizade, paciência, companheirismo para coisas cotidianas e não cotidianas, conselhos, pelo exemplo de vida e superação e por todo carinho, muito obrigado, eu amo você. E a *André Lisboa Rennó* pelo companheirismo, amizade, idas aos jogos da Ponte Preta e pelo exemplo de humildade e hombridade.

A todos meus colegas e professores de minha graduação, meu eterno agradecimento, sem vocês nunca teria chego até aqui.

Aos meus amigos de república: *André Garcia, Wilson Carvalho, Murilo Cardoso, Francisco Estrela, Lucas Faveri, Rodolfo Francisquinho, Marco Aurélio, Ronny Moitinho, Hugo Valadares, Danilo Carvalho, Ives Bernadelli, Larissa Kato, Júlia Varela e Carolina Moraes*, pela paciência e pelo convívio.

Aos meus amigos de sempre *Guilherme Nunes Lobo, Douglas Calori, Christiano Garcia Santin e Luciano Garcia Santin*, pela amizade eterna.

A todos meus familiares, especialmente ao meu pai *Umbelino*, minha mãe *Audaci*, e meus irmãos *Thiago e Diego*, muito obrigado por tudo, eu amo vocês eternamente. E as novas integrantes da família minhas cunhadas *Yara e Luana*, apesar de não parecer, eu amo vocês também.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e do Programa de Pós-Graduação de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP.

À todos que fizeram parte diretamente e indiretamente de deste trabalho e de toda minha vida. Muito obrigado por tudo!

E principalmente à Deus, fonte de toda vida.

*“O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade.”*

Vitor Hugo

Resumo

Vesículas da membrana externa ou *outer membrane vesicles* (OMV) são nanopartículas liberadas no meio de cultura durante o crescimento bacteriano resultantes de evaginações da membrana externa. A OMV é composta por antígenos presentes na membrana externa bacteriana, como porinas e lipo-oligossacarídeos – LOS, proporcionando a estas estruturas um efeito imuno-estimulatório, sendo alvo potencial para a produção de vacinas. Este trabalho teve como objetivo analisar a utilização de OMV de *Neisseria meningitidis* IAL 2443, linhagem pertencente ao sorogrupo B causadora de meningites no estado de São Paulo, com nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-15 e SBA-16 no processo de imunização vacinal. Utilizou-se o processo fermentativo em estado semi-sólido para o crescimento bacteriano e um processo de ultracentrifugação para isolamento da OMV. Comparou-se a produção de OMV de linhagens de *N. meningitidis* selvagens IAL 2443 e C2135 e mutante *knock-out* para o gene responsável pela produção de pilina – C2135 Δ *pile*. A atividade imunológica foi verificada por meio da imunização em camundongos *Swiss* e a verificação da citotoxicidade foi realizada em cultura celular utilizando células VERO e NHI 3T3. Os resultados mostraram que as diferentes linhagens de *N. meningitidis* possuem cinéticas de produção de OMVs distintas em tempo e quantidade. A não expressão de *pile* também afeta a cinética da produção dessas estruturas. O uso de adjuvantes de sílica mesoporosa SBA- 15 e SBA- 16 com a OMV IAL 2443 aumenta o reconhecimento pelo sistema imunológico, conseqüentemente elevando o número de anticorpos específicos frente a mesma cepa bacteriana e a outras linhagens do mesmo sorotipo e sorotipos diferentes. O teste de citotoxicidade em células VERO e NHI 3T3 demonstrou inocuidade nas preparações com SBA- 15 e SBA- 16, atestando a segurança no uso destas preparações como adjuvantes vacinais. O estudo demonstrou que a

metodologia utilizada para produção de OMV é vantajosa do ponto de vista quantitativo e econômico e o uso de SBA- 15 e SBA- 16 apresenta potencial como adjuvante em vacinas baseadas em OMV.

Abstract

Outer membrane vesicles or OMV are nanoparticles released into the culture medium during bacterial growth resulting from evaginations of the outer membrane. The OMV consists of antigens present in the bacterial outer membrane, like porins and lipooligosaccharides - LOS, these structures provide an immuno-stimulatory effect, and potential target for vaccine production. This study aimed to analyze the use OMV of *Neisseria meningitidis* IAL2443, belonging to serogroup B strain causing meningitis in São Paulo, as vaccine using the mesoporous silica SBA-15 and SBA-16 in the immunization process. Fermentation process was used in semi-solid state for bacterial growth and a process of ultracentrifugation for the isolation these OMV. It was compared to OMV production of strains of *N.meningitidis* strains IAL 2443 and C2135, and knock-out mutant for the gene responsible for producing pilin - C2135 Δ pilE. The immunological activity was measured by immunization in Swiss mice and verification of cytotoxicity was performed in cell culture using VERO cells and NIH 3T3. The results showed that different strains of *N. meningitidis* have OMVs kinetics of production of different time and quantity. The expression does not pile also affects the kinetics of production of these structures. The use of adjuvants mesoporous silica SBA-15 and SBA-16 with the IAL2443 OMV increases the recognition by the immune system, thus bringing the number of specific antibodies against the same bacterial strain and other strains of the same serotype and different serotypes. The cytotoxicity test in NIH 3T3 cells showed VERO and safety in preparation adjuvanted with SBA-15 and SBA-16, confirming the safe use of these preparations as vaccine adjuvants. The study showed that the methodology used for the production of OMV is advantageous from the point of view of quantity and cost and use of SBA-15 and SBA-16 has potential as an adjuvant in vaccines based on OMV.

Lista de abreviaturas:

BHE: Barreira Hematoencefálica

BHI: “*Brain Heart Infusion*”, Agar infusão cérebro e coração

CTAB: “*cetyltrimethylammonium bromide*”, brometo de cetil trimetil amônio

D.O.: densidade óptica

D: “*Dimension*”, Dimensão

DNA: ácido desoxirribonucléico

GC: meio de cultura bacteriano sólido seletivo para *Neisseria*

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

INF- γ : *interferon gamma*

IPTG: isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo

kb: kilobase

LA: meio de cultura bacteriano Luria Bertani sólido

LB: meio de cultura bacteriano Luria Bertani líquido

LOS: lipooligossacarideo

M: molar

MM: massa molar

OMV- “*outer membrane vesicle*”, vesícula de membrana externa

PBS: “*phosphate-buffered saline*”, solução salina tamponada com fosfato

qsp: quantidade suficiente para

RPM: rotações por minuto

SBA-15: Nanopartícula de Sílica Santa Barbara 15

SBA-16: Nanopartícula de Sílica Santa Barbara 16

SDS: “*sodium dodecyl sulfate*”, Dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

SiO₂: Dióxido de Silício

SNC: Sistema Nervoso Central

spp: espécies

Th-1: linfócito T *helper-1*

Th-2: linfócito T *helper-2*

TNF- α : fator de necrose tumoral – alfa

U: unidade

UFC: Unidade formadora de colônia

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-galactopiranosídeo

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho

Tabela 2- Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no trabalho

Lista de Figuras

Figura 1. Superfície da membrana celular da *N. meningitidis*.

Figura 2. Vesículas de membrana externa (OMV) de *Neisseria meningitidis* (a) e representação esquemática da liberação de OMV (B).

Figura 3. Fluxograma da extração da OMV por ultracentrifugação.

Figura 4. Modelo esquemático da imunização de camungongos fêmeas Swiss com OMV, OMV+SBA-15 e OMV+SBA-16.

Figura 5. Concentração protéica ao longo do tempo após a inoculação das bactérias. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C2135 e B2443 (cepas bacterianas de *N. meningitidis*).

Figura 6. Concentração protéica ao longo do tempo após a inoculação das bactérias. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C2135 e C2135 Δ *pile*.

Figura 7. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* IAL 2443 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Figura 8. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano IAL 2443.

Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura das sílicas mesoporosas SBA-15 (a - superior) e SBA-16 (a - inferior). Microscopia eletrônica de transmissão vista superior dos poros de SBA-15 (b – superior) e SBA-16 (b- inferior), também visualização perpendicular desses poros do SBA- 15 (c- superior) e SBA-16 (c- inferior).

Figura 10. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* B4 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Figura 11. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano B4.

Figura 12. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* P2354 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL

2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Figura 13. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano P2354.

Figura 14. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* C2135 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Figura 15. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano C2135.

Figura 16. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* P2143 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL

2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Figura 17. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano P2143.

Figura 18. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* Y USA utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Figura 19. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano Y USA.

Figura 20. Teste de citotoxicidade celular das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 em diferentes concentrações frente à célula 3T3 utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

Figura 21. Teste de citotoxicidade celular da OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 (omv IAL 2443) isolada e OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 associadas com a nanopartículas SBA-15 (omv IAL 2443 + SBA-15) e SBA-16 (omv IAL 2443 + SBA-16) em diferentes concentrações frente a célula VERO utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

Figura 22. Teste de citotoxicidade celular das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 em diferentes concentrações frente à célula VERO utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

Figura 23. Teste de citotoxicidade celular da OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 (omv IAL 2443) isolada e OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 associadas com a nanopartículas SBA-15 (omv IAL 2443 + SBA-15) e SBA-16 (omv IAL 2443 + SBA-16) em diferentes concentrações frente a célula VERO utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

Índice

1. Introdução	1
1.1 Caracterização Bioquímica e Classificação de <i>Neisseria meningitidis</i>	2
1.2 Epidemiologia e patogenicidade de <i>Neisseria meningitidis</i>	3
1.3 Histórico de Vacinas de meningococo	8
1.4 Vesículas da membrana externa (<i>Outer Membrane Vesicles</i> - OMV)	9
1.5 Adjuvantes	11
1.6 Nanobiotecnologia	12
2. Objetivos	14
3. Material e Métodos	16
3.1 Meios de Cultura	17
3.1.1 Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar	17
3.1.2 Ágar Chocolate	17
3.1.3 Meio GC	17
3.1.4 Meio Luria Bertani (LA e LB)	18
3.2 Métodos	18
3.2.1 Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento	19

3.2.2 Construção do mutante <i>Neisseria meningitidis</i> C2135 Δ <i>pile</i>	19
3.2.2.1 Extração DNA Genômico	20
3.2.2.1.1 Solução de CTAB/NaCl	20
3.2.2.1.2 Metodologia da Extração DNA Gênomico	20
3.2.2.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	21
3.2.2.3 Ligação dos Fragmentos do Gene <i>pile</i>	23
3.2.2.4 Clonagem em pGem®-T Easy (Promega) do fragmentos amplificado por PCR para inativação gênica	24
3.2.2.5 Transformação em Células Competentes de <i>Escherichia coli</i>	24
3.2.2.5.1 Preparo de Células competentes de DH5- α	24
3.2.2.5.2 Processo de Transformação do pDAA1 em <i>Escherichia coli</i> linhagem DH5- α	25
3.2.2.6 Extração de DNA Plasmidial em Média Escala	26
3.2.2.6.1 Soluções	27
3.2.2.6.2 Metodologia de extração plasmidial em media escala	27
3.2.2.7 Inserção do gene de resistência a Eritromicina	28
3.2.2.8 Processo de Transformação do pDAA2 em <i>Escherichia coli</i> linhagem DH5- α	30

3.2.2.9 Processo de Transformação do pDAA2 em <i>Neisseria meningitidis</i> linhagem C2135	30
3.2.3 Método de extração da vesícula de membrana externa (OMV)	31
3.2.4 Dosagem Protéica	33
3.2.5 Nanopartículas Sílica mesoporosa	33
3.2.6 Imunização	34
3.2.7 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	35
3.2.8 Teste de Citotoxicidade Celular	36
3.2.8.1 Crescimento celular.	36
3.2.8.2 Teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho- Neutro	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1 – Padronização da extração de OMV's e análise do efeito na produção de OMV's na cepa C2135 Δ <i>pile</i>	38
4.2 Análise por ELISA do soro dos camundongos imunizados com OMV de <i>N. meningitidis</i> IAL 2443 com e sem associação das nanopartículas SBA-15 e SBA-16.	43
4.3 Análise por ELISA do soro dos camundongos imunizados com OMV de <i>N. meningitidis</i> IAL 2443 com e sem associação das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 frente a outras linhagens de meningococo.	48

5. Conclusões	66
6. Bibliografia	68
7. Anexos	82

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Caracterização Bioquímica e Classificação de *Neisseria meningitidis*

As bactérias do gênero *Neisseria*, pertencentes à família *Neisseriaceae*, são diplococos gram-negativos, não flagelados e não esporulados. Tais bactérias medem entre 0,6 e 1,5 µm e algumas apresentam estrutura capsular. Tratam-se de bactérias catalase e citocromo oxidase positivas, quimiorganotróficas, aeróbias e, geralmente isoladas de mucosas humanas (KNAPP and CLARK, 1984; ANTIGNAC, 2003). O gênero apresenta 14 espécies, sendo importantes causadores de meningite e gonorréia, respectivamente: *Neisseria meningitidis* (meningococo) e *N. gonorrhoeae* (gonococo). Apesar de apresentarem diversas características em comum, tais organismos se diferenciam principalmente na expressão de polissacarídeo capsular. Enquanto o gonococo não apresenta estrutura capsular, linhagens de meningococo geralmente apresentam diversos tipos capsulares, os quais servem como base para classificação (HITCHCOCK, 1989; ANTIGNAC, 2003; ASPHOLM *et al.*, 2010; HILL *et al.*, 2010).

Os diferentes tipos de cápsula de *N. meningitidis*, determinam a subdivisão da espécie em sorogrupos. Taxonomicamente, as linhagens de *N. meningitidis* são classificadas em treze sorogrupos de acordo com especificidade imunológica e a estrutura do polissacarídeo capsular: A, B, C, D, 29E, H, K, I, L, X, Y, W135 e Z. Destes, cinco sorogrupos, A, B, C, Y e W135, são os mais frequentemente associados aos casos invasivos de meningite (TAHA *et al.*, 2002; STEPHENS *et al.*, 2007; HILL *et al.*, 2010).

A tipagem sorológica de *N. meningitidis* é utilizada para determinar a “fórmula antigênica” de isolados desta espécie, a qual consiste no Sorogrupo: Sorotipo: Subtipo. Estes dois últimos são determinados pelo tipo de porinas, respectivamente, PorB e PorA (TAHA *et al.*, 2002; HILL *et*

al., 2010), as quais são as proteínas mais abundantes na superfície dos meningococos (VAN DER LEY *et al.*, 1991; MASSARI *et al.*, 2000).

Existem outros tipos de classificação da espécie em questão, como é o caso da baseada no tipo de Lipooligossacarídeo (LOS) presente na superfície bacteriana. Os LOS são codificados por uma família de genes *lgtA-E* e *lgtG*, cuja variação e combinação dividem a espécie em treze Imunotipos (SCHNEIDER *et al.*, 1984; JENNINGS *et al.*, 1999).

1.2 Epidemiologia e patogenicidade de *Neisseria meningitidis*

Historicamente a doença meningocócica constitui um sério problema de saúde pública mundial (CAUGANT *et al.*, 1986; FRASCH, 2001), sendo responsável por grandes problemas epidemiológicos durante a primeira e segunda guerra mundial, na Europa e nos Estados Unidos (FRASCH, 1995).

No Brasil, a meningite meningocócica foi observada pela primeira vez em São Paulo no ano de 1906. Em 1945 houve uma epidemia de *N. meningitidis* sorogrupo A que se estendeu até 1951 (GOMES *et al.*, 1950; IVERSSON, 1976; POOLMAN, 1990). Em 1971 ocorreram duas novas epidemias na grande São Paulo, uma causada por *N. meningitidis* C e outra pela *N. meningitidis* A (BARATA, 1988).

O meningococo é um microorganismo frágil que não sobrevive a grandes mudanças ambientais, como variações de pH, temperatura e umidade. Logo, sua transmissão ocorre por contato direto através de secreções respiratórias ou saliva. A espécie humana é o único hospedeiro natural desse patógeno-ocasional, cujo reservatório se localiza na nasofaringe. A interação entre *N. meningitidis* e seu hospedeiro varia de comensal, caracterizada por colonização assintomática da nasofaringe, a infecção invasiva (DE VRIES *et al.*, 1996; TAHA *et al.*, 2002).

Globalmente, a taxa de colonização meningocócica em adultos sadios varia entre cerca de 10 a 35 % (CARTWRIGHT *et al.*, 1987; BREHONY *et al.*, 2007). Entretanto, em populações cujos indivíduos permanecem em contato próximo, como ambientes universitários, a taxa de colonização pode se aproximar a 100 % (CARTWRIGHT, 1995).

Apesar da colonização de células da nasofaringe ser um passo crucial para o processo infeccioso de *N. meningitidis*, não foi ainda determinado o que desencadeia a passagem dessa bactéria pela barreira epitelial respiratória e, conseqüentemente, a infecção meningocócica. Esta pode ser apresentada na forma de meningite, quando há invasão bacteriana nas meninges, e/ou meningococemia com sintomas como febre, vômitos, rigidez na nuca e manchas vermelhas na pele (petéquias) (DEVOE, 1982).

É interessante ressaltar que *N. meningitidis* é o principal agente etiológico de meningite piogênica no mundo. Entretanto, para ganhar acesso às meninges, é necessário que o meningococo ultrapasse pela barreira epitelial do sistema respiratório, corrente sanguínea e finalmente a barreira hematoencefálica (BHE). Pouco se conhece sobre como essa bactéria consegue cruzar essas duas importantes barreiras físicas do sistema imunológico humano. Contudo, sabe-se que certas estruturas presentes na superfície de *N. meningitidis* estão intimamente envolvidas não apenas na adesão às barreiras celulares, mas, também no escape do sistema imune.

Uma dessas estruturas é a cápsula, considerada como o maior fator de virulência do meningococo (LANCELLOTTI *et al.*, 2006). Tal estrutura tem como função a inibição da atividade bactericida do complemento humano, retardando a opsonização e fagocitose por células específicas, além de aumentar a sobrevivência de tais bactérias no ambiente. De acordo com

Dolan-Livengood *et al.* (2003), a ausência do polissacarídeo capsular pode facilitar a adesão de *N. meningitidis* em células do epitélio respiratório, sendo muito comum a presença de linhagens não-capsuladas em seu reservatório natural, a nasofaringe humana.

A cápsula é composta por derivados do ácido siálico ou ácido N-acetil-neuramínico e está relacionado ao *switch* capsular, um mecanismo pelo qual o meningococo é capaz de escapar da resposta imune a um determinado sorogrupo (LANCELLOTTI *et al.*, 2006). Tal processo de *switch* capsular, ou comutação capsular, é um fenômeno no qual uma linhagem adquire a capacidade de expressar outro tipo capsular (SWARTLEY *et al.*, 1997). Isso ocorre devido à transmissão horizontal de material genético entre diferentes sorogrupos, resultando em substituição homóloga do gene *synD* através dos processos de transformação e recombinação. Linhagens do tipo C, por exemplo, através deste processo, podem ser transformadas em linhagens do sorogrupo B. Como *N. meningitidis* é naturalmente competente ao processo de transformação bacteriana, é frequente a ocorrência de trocas horizontais de DNA entre linhagens (LANCELLOTTI *et al.*, 2006).

Outros componentes da superfície bacteriana que também atuam como fatores de virulência têm sido alvos para o desenvolvimento de vacinas (URWIN *et al.*, 2004). Entre tais componentes, encontram-se as porinas (VAN DER LEY *et al.*, 1991; MASSARI *et al.*, 2000). Tais proteínas atuam como poros na membrana bacteriana e são importantes adjuvantes e estimulantes do sistema imune humano. Acredita-se que as proteínas atuem como adjuvantes por estimularem a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de linfócitos B. Além disso, as porinas atuam como mitógenos destes linfócitos e interagem sinergicamente com CD40 de modo a induzir a proliferação de células B e secreção de imunoglobulinas (MASSARI *et al.*, 2000).

A fímbria, ou pili, também é um constituinte da membrana externa do meningococo. Trata-se de uma estrutura protéica que se exterioriza da superfície da célula bacteriana e é formada por subunidades chamadas pilinas (VAN DER WOUDE *et al.*, 2004). Em *Neisseria spp*, as pilinas são sintetizadas pelo gene *pilE* e sua expressão também está submetida também à variação de fase (TONJUM *et al.*, 1997). Além de estar envolvido no processo de adesão, o pili é importante em fenômenos de transformação (DUBNAU, 1999) pois linhagens desprovidas dessa estrutura perdem a competência natural ao processo em questão (PRON *et al.* 1997).

Sabe-se também, que o pili do tipo IV (a pilina do meningococo) é o principal responsável pelo fenômeno de adesão de meningococos encapsulados em células epiteliais e endoteliais (SCHEUERPFUG *et al.*, 1999; MAIREY *et al.*,2006) , como é o caso das células endoteliais dos capilares das meninges e do plexo coróide (PRON *et al.*, 1997). Esse tipo de pili está também envolvido no processo de aglutinação de eritrócitos. É interessante ressaltar que a variação antigênica do pili modula a adesão às células humanas e, conseqüentemente, a patogenicidade do meningococo, pois a adesão a determinadas células é um passo crucial para o início da infecção (PRON *et al.*, 1997; DEGHRANE *et al.*,2002). Isso pode ser elucidado pelo fato de que culturas primárias de isolados clínicos de *N. meningitidis* apresentam, invariavelmente tais estruturas (MAIREY *et al.*,2006).

Outro componente antigênico do meningococo é o LOS. Estudos sugerem que a ligação e interação do LOS do meningococo com receptores Toll-like (TLR4) em macrófagos humanos e em outras células do hospedeiro seja responsável pela a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas através da ativação do fator de transcrição NFκB (*nuclear factor κB*) (INGALLS *et al.*, 2001; ZUGHAIER *et al.*, 2004). Assim, acredita-se que tal molécula seja o principal

responsável pela resposta inflamatória do hospedeiro durante a síndrome séptica (SCHNEIDER *et al.*, 1984; JENNINGS *et al.*, 1999; ZUGHAIER *et al.*, 2004).

As proteínas de opacidade, Opa, são também fatores de virulência do meningococo. Estas são proteínas integrais de membrana com função de adesina, envolvidas na adesão e na subsequente invasão a células endoteliais e epiteliais humanas. Tais moléculas reconhecem receptores humanos, dentre estes destacam-se os receptores CEACAM (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) (DE JONGE *et al.*, 2003; CALLAGHAN *et al.*, 2006). Ainda, proteínas Opa podem atuar como imunomoduladores, de modo a possibilitar interações com células T CD4, neutrófilos e macrófagos (CALLAGHAN *et al.*, 2006).

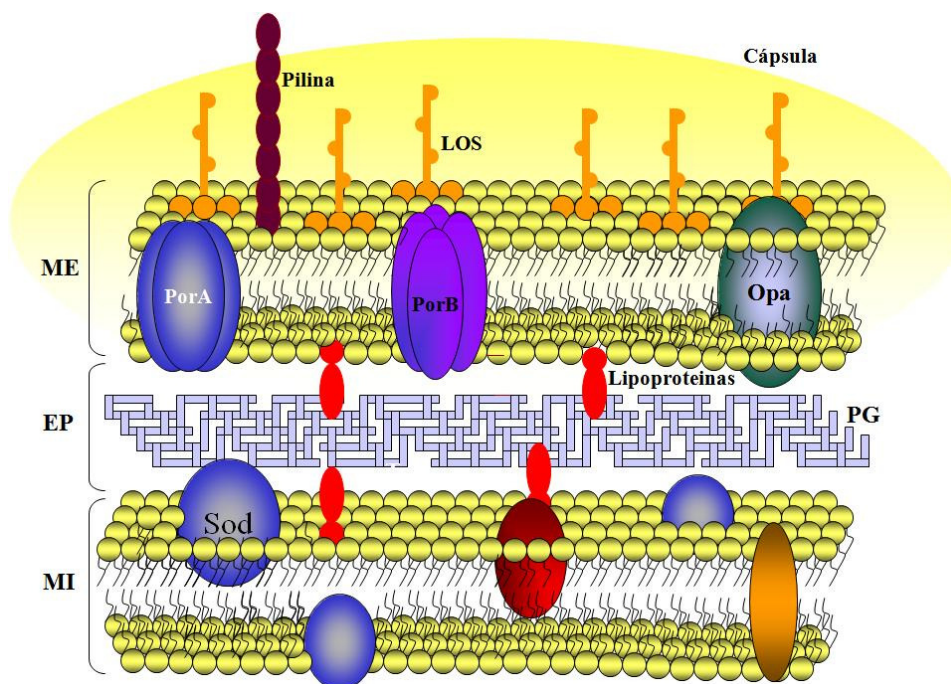


Figura 1. Superfície da membrana celular da *N. meningitidis*. ME: Membrana Externa, EP: Espaço Periplasmático, MI: Membrana Interna, LOS: Lipooligossacarídeo, PorA: Porina A, PorB: Porina B, Opa: Proteína de Opacidade, PG: Peptídeooglicano e Sod: Superóxido Desmutase (LANCELLOTTI, 2005).

Sabe-se que a imunidade à infecção meningocócica é dependente da imunoglobulina G (IgG) que juntamente com o sistema do complemento atuam com função bactericida. No início da infecção meningocócica, o complemento é ativado principalmente através da via alternativa e sua inativação é correlacionada à severidade do choque séptico causado (VAN DEUREN *et al.*, 2000; ROBINSON *et al.*, 2002). Também está relacionada à gravidade da septicemia e da infecção meningocócica a alta contração sérica de citocinas.

Além de TNF- α , durante a infecção meningocócica há uma significativa expressão de interferon gamma (INF- γ) (KORNELISSE *et al.*, 1997), das interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 e de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e IL-12 (VAN DEUREN *et al.*, 2000; ROBINSON *et al.*, 2002). A liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-8 promove o relaxamento das junções oclusivas que constituem a barreira hemato-encefálica, levando a uma maior permeabilidade dessa barreira (SCHUBERT-UNKMEIR *et al.*, 2010).

1.3 Histórico de Vacinas de meningococo

As primeiras vacinas eficazes contra meningococos foram constituídas de polissacarídeos capsulares purificados. Tais vacinas foram desenvolvidas contra os sorogrupos A, C, Y e W135. No entanto, não há uma vacina eficaz contra o sorogrupo B, responsável por grande parte dos casos de meningite em diversos países (VAN DER LEY *et al.*, 1995). Acredita-se que o polissacarídeo capsular do sorogrupo B seja não-imunogênico devido à presença, na cápsula, da molécula de ácido α -2,8-N-acetil neuramínico, a qual é imunologicamente muito similar ao ácido siálico humano. Assim, uma abordagem alternativa seria a vacina baseada em proteínas expostas na superfície da membrana externa ou, no caso, presentes na superfície de vesículas de membrana externa, OMV (BORROW *et al.*, 2005; COMANDUCCI *et al.*, 2002; FRASCH, 1995).

Todas as vacinas contra meningococos do sorogrupo B disponíveis comercialmente e em testes clínicos são baseadas em OMVs. Entre as comercializadas, encontra-se a vacina cubana, VAMENGOC-BC® extraída da cepa Cu385/83 e polissacarídeo do grupo C (PSC) (MILAGRES et al., 1998; MILAGRES et al., 1994), a vacina norueguesa, Folkehelsa®, formulada com OMV extraídas da cepa 44/76 (FREDERIKSEN et al., 1991; JÓDAR et al., 2002; MORLEY; POLLARD, 2002; ZOLLINGER, 1997) e a vacina hexavalente holandesa Hexamen, composta de OMVs de duas cepas cada uma expressando três subtipos diferentes de porina A (CLAASSEN et al., 1996).

Em função da situação epidemiológica no Brasil, no final dos anos 80, foi administrada a vacina VA-MENGOC-BC®, em crianças e adolescentes, a maioria vacinada dos três meses aos nove anos de idade com duas doses. A eficácia da vacina foi avaliada pelo Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, em iniciativa conjunta da Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo e da Organização Panamericana de Saúde, em colaboração com a Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos. Concluiu-se que a vacina cubana era dependente da idade, sendo que nenhuma proteção era observada em crianças menores de 24 meses (JÓDAR et al., 2002; MORLEY; POLLARD, 2002; ZOLLINGER, 1997; MORAES et al., 1992; MILAGRES et al., 1994). Doze meses após a segunda dose, a eficácia geral da vacina foi de 54-57% com comprovação de ausência de resposta em crianças menores de 2 anos, que corresponde à faixa etária de maior risco para o desenvolvimento dessa doença (MORAES et al., 1992; MILAGRES et al., 1994; NORONHA et al., 1995). Esses resultados foram posteriormente confirmados em ensaios clínicos com a mesma vacina cubana, no Chile (BOSLEGO et al., 1995).

1.4 Vesícula da membrana externa (OMV)

As vesículas da membrana externa têm de 10 a 100 nm de diâmetro, são liberadas no meio de cultura durante o crescimento bacteriano e são resultantes de evaginações da membrana externa (DEVOE, 1973; POOLMAN, 1995). Essas vesículas apresentam interesse imunogênico porque são constituídas de todos os componentes presentes na superfície da membrana externa da bactéria, isto é, polissacarídeos, fosfolipídeos, lipooligossacarídeos e principalmente proteínas (JOHNSTON; GOTSCHLICH, 1974).

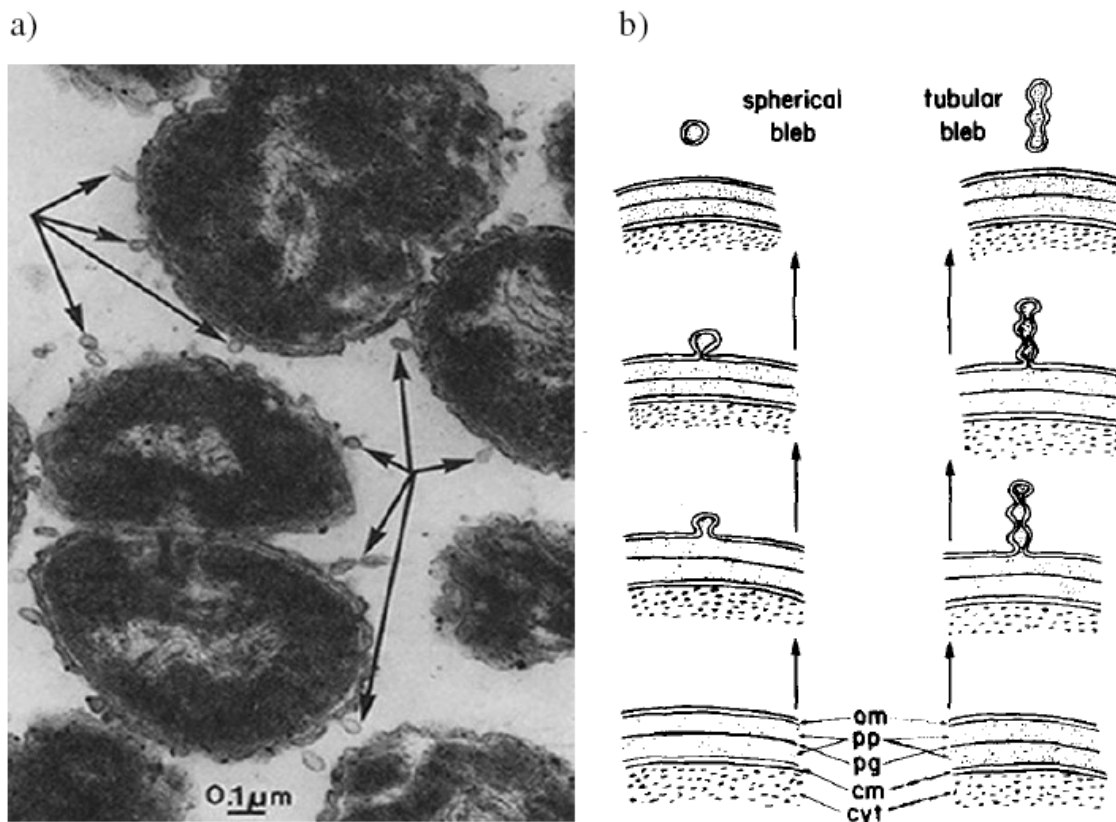


Figura 2. Vesículas de membrana externa (OMV) de *Neisseria meningitidis* (a) e representação esquemática da liberação de OMV (B). (DEVOE e GILCHRIST, 1973).

1.5 Adjuvantes

O termo adjuvante originou-se da palavra latina *adjuvare* que significa ajudar. Estas são substâncias que amplificam e/ou modulam a imunogenicidade intrínseca de um determinado antígeno também são capazes de modular a resposta imune em indivíduos constitutiva ou eventualmente maus respondedores, tais como idosos, imunossuprimidos e aqueles submetidos a condições de subnutrição e de insalubridade (EDELMAN; TACKET, 1990; SCHIJNS, 2000).

O interesse no estudos dos adjuvantes é antigo. Desde 1925, diversos adjuvantes vêm sendo usados com o objetivo de aumentar a resposta imune contra antígenos específicos. Os primeiros estudos foram relatados por Ramon (1925; 1926) que demonstraram ser possível aumentar artificialmente os níveis das antitoxinas tetânica e diftérica pela adição à vacina de substâncias como o ágar, sais metálicos, óleo, lectina ou saponina.

A natureza química dos adjuvantes utilizados em vacinas é bastante variada. Alguns dos mais utilizados são: a) os compostos de alumínio, tais como fosfato e hidróxido de alumínio que são aprovados para uso clínico em humanos e animais (LIMA, 2008), induzindo produção de respostas imunológicas 90% para uma tendência TH2 (COX & COULTER, 1997); b) uma combinação de sais de alumínio com MPL; c) combinação de MPL com uma fração purificada do extrato de saponina de *Quillarja saponina* (QS-21) e uma emulsão de óleo em água; d) endotoxinas bacterianas e derivados como LPS que induzem principalmente resposta TH-1 (PASHINE *et al.*, 2005; LIMA, 2008), como o MPL, adjuvante na vacina para alergia Pollinex Quattro, licenciado em alguns países (BRENNAN & DOUGAN, 2005; LIMA, 2008); e) e óleos minerais e vegetais (LIMA, 2008).

Várias substâncias estão sendo avaliadas quanto à sua possível atividade adjuvante e muitas se encontram em estado avançado nos ensaios clínicos. Entretanto, algumas estão associadas a uma alta toxicidade e casos de hipersensibilidade, fato que dificulta sua introdução na rotina clínica (O'HAGAN; MACKICHAN, 2001; PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

1.6 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é uma área da nanotecnologia que envolve o uso de materiais de escala nanométrica no estudo e desenvolvimento de produtos biológicos como fármacos e vacinas. Sabe-se que nanoestruturas são utilizadas no estudo de microrganismos desde 2003 (ZHAO, 2004). O uso de nanomaterial orgânico e inorgânico atualmente se encontra em foco como ferramenta promissora para estudos sobre diversas áreas da biologia, como o tratamento e diagnóstico do câncer, atividade antimicrobiana (ZHAO, 2004) e alteração do processo de transformação bacteriana (ROJAS-CHAPANA *et al.*, 2005; MATTOS *et al.*, 2011; HOLLANDA *et al.*, 2011).

Recentemente, Hollanda *et al.* (2011), descreveram a influência de nanopartículas de sílica e carbono como adjuvantes em vacinas contra *N. meningitidis*. Tais estruturas atuam de modo a diminuir o escape vacinal do meningococo, um dos maiores problemas relacionados à vacinação contra este patógeno (HOLLANDA *et al.*, 2011). Para evitar o escape, o antígeno vacinal tem que se apresentar como poliantigênico já que a bactéria teria que modificar não somente um mas vários componentes de sua superfície. Tal fato destaca as OMVs, compostas por diversos componentes antigênicos e não possuem nenhum processo de escape relacionado até o momento (ULI, 2006; YERO, 2007).

Neste estudo, foram utilizadas duas nanopartículas com diferentes características estruturais como adjuvantes: SBA-15 e SBA-16. Ambas são compostas por SiO₂, mas SBA-15 apresenta

canais dispostos em estrutura hexagonal bidimensional, já SBA-16 é um exemplo de sílica mesoporosa em formato tridimensional cúbico.

OBJETIVOS

2. Objetivos

- O objetivo deste trabalho é a obtenção de uma vacina à partir de vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles* - OMV) de *N. meningitidis*, utilizando como adjuvantes nanopartículas de sílica mesoporosa;

Objetivos específicos:

- Verificar a viabilidade da técnica de ultrafiltração em membrana de nitrocelulose para a obtenção das vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles* - OMV);

- Comparar a cinética de produção de vesículas de membrana externa em linhagens de *N. meningitidis* selvagem e mutante *knock-out* para o gene responsável pela produção de pilina – *pilE*;

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Meios de Cultura

3.1.1 Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar

Foi utilizada a forma comercializada na concentração de 37 g/L pela Acumedia (Lansing, Michigan, USA). O material foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Para o preparo do BHI Ágar, adicionou-se 1,5 % de ágar ao meio de cultura líquido antes da esterilização pelo calor úmido (autoclave).

3.1.2 Ágar Chocolate

Após a esterilização de BHI Ágar, a uma temperatura de 80 °C, foi adicionado 5% de Sangue Desfibrilado de Cavalo.

3.1.3 Meio GC

Cloreto de sódio.....	5 g
Extrato de Levedura.....	6 g
Proteose Peptona.....	15 g
Amido de Batata.....	1,5 g
K ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL
Ágar.....	15 g

O material foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após isso, a uma temperatura de 56 °C, foi adicionado o seguinte suplemento, o qual foi esterilizado por filtração:

Glicose.....	1 g
Bicarbonato de Sódio.....	0,15 g
Ácido Glutâmico.....	0,1 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

3.1.4 Meio Luria Bertani (LA e LB)

O meio de cultura LA e LB contém a mesma composição, eles se diferem pela presença de ágar (15 g/L) no meio LA.

Triptona.....	10 g
Extrato de levedura.....	5 g
NaCl.....	10 g
Água deionizada qsp.....	1000 mL

O material foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

3.2 Métodos

3.2.1 Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento

Todas as linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas no presente trabalho e suas origens foram descritas na tabela 1. Para as linhagens de *Neisseria meningitidis* foram cultivadas

utilizando-se a técnica de esgotamento em ágar chocolate à 37 °C à 5% de CO₂ por um período de 18-24 horas. Para o cultivo dos meningococos, foram utilizadas as mesmas condições, o meio GC. Para o crescimento da linhagem de *E.coli* DH5 ∞ foram utilizados os meios LA e LB, dependendo da necessidade, e incubados à 37 °C por 18-24 horas.

Para sua manutenção, as amostras foram suspensas em meio infusão de cérebro-coração (BHI) ao qual foi adicionado glicerol a 30 % e mantidas a -80 °C.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho

Linhagem	Características	Origem
<i>N. meningitidis</i> C2135	Sorogrupo C, BIOMERIEUX C2135	INCQS
<i>N. meningitidis</i> B4	Sorogrupo B4:P1-7,16	IAL
<i>N. meningitidis</i> P2143	Sorogrupo C:NT: P1.18-1,3 Cluster A4, ST8, líquido	INCQS
<i>N. meningitidis</i> P2354	Sorogrupo B: NT:P1.7-2,3 Cluster A4, líquido, SC, Brasil	INCQS
<i>N. meningitidis</i> Y USA	<i>N. meningitidis</i> isolada em surtos epidêmicos nos EUA	IAL
<i>N. meningitidis</i> IAL 2443	Sorogrupo B:4,7:P1-15,19, <i>N. meningitidis</i> endêmica do Brasil	IAL
<i>E.coli</i> DH5 ∞	Nal ^R utilizada como receptora de plasmídios. F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gir</i> A96, <i>relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983

IAL – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

INCQS – FIOCRUZ – Instituto Nacional de Controle de Qualidade - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

3.2.2 Construção do mutante *Neisseria meningitidis* C2135 Δ *pilE*

3.2.2.1 Extração DNA Genômico

3.2.2.1.1 Solução de CTAB/NaCl

Pesaram-se 8 g de brometo de cetramônio (Sigma Cat. No.H5882), 4,1 g de NaCl e estes foram dissolvidos em 80 mL de água deionizada aquecida a 65 °C, sendo o volume completado para 100 mL.

Tampão Tris- EDTA pH 8,0 (TE pH 8,0)

Tris-HCl.....10 mM

EDTA.....1,0 mM

3.2.2.1.2 Metodologia da Extração DNA Gênomico

DNA genômico bacteriano foi isolado do crescimento de 18 horas de colônias de *N. meningitidis* em ágar chocolate incubado a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%. Uma suspensão bacteriana (DO_{600nm} = 2,00), em 400µL de tampão TE pH 8,0 (SAMBROOK *et al.*, 1989), foi adicionada a uma mistura de 70µL de 10% SDS e 5µL de Proteinase K a 10mg/ml. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 65 °C por 10 minutos. Foram adicionados 100µL de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65 °C de CTAB/NaCl (0,8g/L de brometo de cetramida e 0,4g/L de NaCl). Tal suspensão foi agitada até formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65 °C por mais 10 minutos. Foram adicionados 750µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (v/v) e a mistura agitada por cerca de 10 segundos. O material foi centrifugado a 12000 RPM, sendo o sobrenadante aquoso (600 µL) cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol -20°C. A mistura foi mantida à temperatura de -20°C por 30 minutos.

A solução foi centrifugada a 12000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi, por centrifugação, lavado duas vezes com solução de etanol 70% a -20°C. O DNA foi seco à temperatura ambiente e diluído com movimentos cuidadosos e circulares em 100 µL de água MiliQ esterilizada. A dosagem de DNA realizou-se como descrito por Sambrook *et al.* (1989), onde a concentração e pureza do DNA foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O ácido nucléico extraído foi conservado à temperatura de -20°C.

3.2.2.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A sequência do gene *pilE* foi obtida através do GenBank GI: 861062 contida no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para amplificação do gene *pilE*, foi utilizado como DNA genômico da linhagem *N. meningitidis* C2135 como DNA *template*, utilizando os *primers* inicializadores presentes na tabela 2.

Tabela 2- Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no trabalho

Primer	Sequência de nucleotídios 5'- 3'	Descrição
<i>pilEi</i> Fw	CGAGCTGATGATTGTGATTGCC	<i>pilEi</i> forward
<i>pilEi</i> Rev	GACGCTTGCCCCACAGGGAGAG	<i>pilEi</i> reverse
<i>pilEf</i> Fw	GGATCCCTCTCCCTGTGGGCCAAG	<i>pilEf</i> forward
<i>pilEf</i> Rev	GCTGGCATCACTTGCGTCGCGG	<i>pilEf</i> reverse
ERAM1	GCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAG	<i>ermAM</i> forward
ERAM 3	AAGCTTGCCGTCTGAATGGGACCTCTTTAGCTTCTTGG	<i>ermAM</i> reverse

Para um volume final de 50 µL de mistura de reação, contendo as especificações do fabricante da enzima *Taq* DNA Polimerase, foi adicionado 50 moles de cada oligonucleotídeo, 2 µL do DNA *template*, solução tamponante da reação 10X na concentração final 1X acrescido de

cloreto de magnésio 2mM e 2,5U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). Posteriormente, o tubo foi submetido à amplificação em termociclador (Gene Amp PCR System 9700), utilizando o seguinte ciclo:

PilEf

94 °C – 5’

55°C- 1’

68 °C- 40’’

92 °C - 30’’

55°C – 1’

68 °C – 40’’

35 ciclos

72 °C – 10’

4 °C - ∞

PilEi

94 °C – 5’

47°C- 2’

68 °C- 1’40’’

92 °C - 30’’

47°C – 2’

68 °C – 1’40’’

35 ciclos

72 °C – 10’

4 °C - ∞

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose (1,5%) contendo brometo de etídeo (0,05%). Como pré-corrída, aplicou-se, inicialmente, uma voltagem

de 20V, até que todo o corante azul penetrasse no gel. Após este procedimento, a voltagem foi aumentada para 100V até que o marcador alcançasse a extremidade oposta do gel. Após o término da corrida, a visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e o tamanho dos fragmentos foi determinado com o uso do *Software Kodak 1D*, tendo-se como padrão de peso molecular o 1kb *DNA-ladder*. Após este procedimento, o gel foi fotografado pelo sistema *GelDoc It – Imaging System*, com filtro vermelho utilizando-se o *software VisionWorks* [®]LS.

3.2.2.3 Ligação dos Fragmentos do Gene *pilE*

Os dois fragmentos amplificados do gene *pilE* foram ligados utilizando T4 DNA ligase seguindo a seguinte reação:

Amplificado <i>pilEi</i>	3 µL
Amplificado <i>pilEf</i>	3 µL
T4 DNA Ligase (1U/µL).....	2 µL
Tampão da ligação 2X.....	4 µL
Água deionizada qsp.....	20 µL

Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel agarose como descrito na seção 3.2.2.2.

Logo após a mistura foi incubada à 4 °C por 3 horas. Uma nova PCR foi realizada utilizando a ligação dos fragmentos como DNA *template*. Os primer inicializados utilizados foram *pilEi Forward* e *pilEf Reverse*, descritos na tabela 2, e a metodologia da PCR e da

confirmação da amplificação, segue descrita na seção 3.2.2.2.. As temperaturas utilizadas foram:

94 °C – 5'	
50°C- 2'	
68 °C- 1'40''	
92 °C - 30''	} 35 ciclos
50°C – 1'	
68 °C – 1'40''	
72 °C – 10'	
4 °C - ∞	

3.2.2.4 Clonagem em pGem®-T Easy (Promega) do fragmentos amplificado por PCR para inativação gênica

Para inserção do fragmento amplificado no plasmídeo foi realizado a seguinte reação:

pGem®-T Easy.....	1μL
T4 DNA Ligase (1U/μL).....	1μL
Fragmento purificado.....	3μL
Tampão da ligação 2X.....	5μL

A mistura foi incubada a 16°C, por um período de 16-18horas. Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel agarose como já descrito acima. Após o processo, denominamos o plasmídeo com o nome pDAA1.

3.2.2.5 Transformação em Células Competentes de *Escherichia coli*

3.2.2.5.1 Preparo de Células competentes de DH5-α

A linhagem de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 100mL meio LB e incubadas a 37°C a 150 RPM até DO - 600nm = 1,00. Este crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de centrífuga previamente conservado a 4°C e, o volume total de crescimento bacteriano centrifugado a 4000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de uma solução esterilizada de CaCl₂, 100mM a 4°C. Esta suspensão foi, novamente, centrifugada à mesma velocidade acima e o sedimento recuperado assepticamente em 8 mL de uma solução de cloreto de cálcio 100 mM adicionada de 30% de glicerol esterilizado. A suspensão foi alíquotada em tubos eppendorf (alíquotas de 500 μ L) e congelada em nitrogênio líquido e, posteriormente, conservada a -80°C (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.2.2.5.2 Processo de Transformação do pDAA1 em *Escherichia coli* linhagem DH5- α

Uma alíquota de 200 μ L de células competentes foi descongelada rapidamente e adicionadas o 10 μ L do plasmídeo pDAA1. A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. Transcorrido esse período a mistura foi submetida ao aquecimento de 42°C durante o tempo limite de 90 segundos. Transcorrido tal tempo, o tubo de reação foi imediatamente mantido em banho de gelo por 3 minutos. Foram adicionados à mistura 800 μ L de meio LB pré-aquecido a 37°C e a mesma incubada à mesma temperatura por no mínimo 1 hora. A seguir, o volume total de transformação foi selecionado em meio LA adicionado ampicilina à 100 mg/L, que é o antibiótico de resistência do plasmídeo e IPTG (isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-Bgalactopiranosídeo), nas concentrações de 0,1 mM e 30 μ g/mL, respectivamente, para seleção dos clones com inserto desejado. As placas foram incubadas por 16-24 horas a 37 °C, e isoladas algumas colônias de cor branca, que contem o

plasmídeo desejado, logo após foi submetida a extração de DNA plasmidial em média escala (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.2.2.6 Extração de DNA Plasmidial em Média Escala

3.2.2.6.1 Soluções

Solução de Tris-HCl (pH 8,0) 1M

A 121,1 g de Tris-base, adicionaram-se 800 mL de água deionizada e 42 mL de HCl concentrado. Completou-se para 1000 mL com água deionizada.

Solução de EDTA (pH 8,0) 0,5 M

Adicionaram-se 186,1 g de EDTA dihidratado em 800 mL de água destilada. Agitou-se vigorosamente e ajustou-se o pH com solução a 10 N de NaOH.

A solução foi distribuída em pequenas alíquotas e autocavadas a 127 °C por 15 minutos.

Solução I

Glicose..... 50 mM

Tris-HCl..... 25 mM (pH 8,0)

EDTA... 10 mM (pH 8,0)

Autoclavou-se a 127 C por 15 minutos e conservou-se em geladeira à 4 C.

Solução II

NaOH 0,2 N.....2,0 mL

SDS 1%.....10,0 mL

Água deionizada qsp.....100,0 mL

Solução III

Solução de acetato de potássio.....60,0 mL

Ácido acético glacial.....11,5 mL

Água deionizada.....28,5 mL

Tampão PBS

NaCl.....8,00 g

KCl.....0,2 g

Na₂HPO₄.....0,61 g

KH₂PO₄.....0,2g

Água deionizada qsp.....1,0 L

Esterilizou-se a 127 °C por 15 minutos.

3.2.2.6.2 Metodologia de extração plasmidial em média escala

O método utilizado para extração de DNA plasmidial baseou-se na técnica de lise alcalina de BIRBOIM & DOLI (1979). A linhagem bacteriana foi inoculada em 50 mL de meio LB

(SAMBROCK *et al.*, 1989), suplementado com antibiótico cuja marca de resistência está contida no plasmídeo, para nosso caso Ampicilina à 100 mg/L e incubadas sob agitação de 150 RPM a 37°C por 12-18 horas. O crescimento bacteriano foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado a 5000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuscitado em 5 mL de solução I gelada e mantido em banho de gelo por 30 minutos. A seguir, 10 mL de solução II foram adicionados, e os conteúdos do tubo misturado por inversão suave e vagarosa. Após o tubo ter sido mantido em banho de gelo por não mais que 5 minutos, 7,5 mL da solução III foram acrescentados ao conteúdo do mesmo e então, novamente, invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por mais 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10000 RPM por 5 minutos e 20 mL do sobrenadante transferidos para outro tubo de centrífuga com a adição de 13 mL isopropanol 100% a -20°C. Após este procedimento, o tubo foi mantido a -20°C por pelo menos 1 hora. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000 RPM por 5 minutos, ressuscitado em 400 µL de água deionizada esterilizada e reprecipitado, adicionando-se solução de NaCl 5M à concentração final de 100 mM, e 1 mL de etanol 100% a -20°C.

O precipitado contendo DNA plasmidial foi lavado por centrifugação com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuscitado com 400 µL água MiliQ esterilizada.

Para confirmação da eficiência da extração foi realizada uma eletroforese em gel agarose, como descrito na seção 3.2.2.2

3.2.2.7 Inserção do gene de resistência a Eritromicina

Depois de realizada a extração do plasmídeo pDAA1 em média escala, o plasmídeo foi digerido com a enzima de restrição *BamHI* seguindo a reação:

Plasmídeo pDAA1.....	5 μ L
Enzima BamHI	2 μ L
Tampão Enzima 10Xconc.....	1 μ L
Água deionizada qsp.....	10 μ L

O tubo com a digestão foi incubada por 3h à 37°C. Para confirmação da eficiência da digestão enzimática foi realizada uma eletroforese em gel agarose, como descrito na seção 3.2.2.2.

Uma PCR, utilizando os *primers* *ERAM1* e *ERAM3*, com suas respectivas sequências nucleotídicas presentes na tabela 2, foi realizada para amplificação para o gene de resistência de Eritromicina, *ermAM*, seguindo a metodologia descrita na seção 3.2.2.2. As temperaturas utilizadas no termociclador foram:

94 °C – 5'	
50°C- 1'	
72 °C- 1'	
92 °C - 1'	} 45 ciclos
50°C – 1'	
72 °C – 1'	
72 °C – 10'	
4 °C - ∞	

Para confirmação da amplificação foi realizada uma eletroforese em gel agarose como descrito na seção 3.2.2.2. Após linearização do plasmídeo pela digestão com *BamHI*, foi inserido o cassette de resistência a eritromicina no plasmídeo através de uma ligação com enzima T4 ligase, seguindo a seguinte reação:

Plasmídeo pDAA1 digerido com <i>Bam</i> HI.....	2 µL
Amplificado <i>ermAM</i>	10 µL
T4 DNA Ligase (1U/µL).....	2 µL
Tampão 5X.....	4 µL
Água Deionizada qsp.....	20 µL

Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel agarose como descrito na seção 3.2.2.2. Após o processo, denominamos o plasmídeo com o nome pDAA2.

3.2.2.8 Processo de Transformação do pDAA2 em *Escherichia coli* linhagem DH5- α

O processo de transformação na *Escherichia coli* linhagem DH5- α foi o mesmo já descrito anteriormente, diferindo apenas pela presença de 2 antibióticos de seleção do plasmídeo presente no meio L.A., sendo eles Ampicilina (100 mg/L) e Eritromicina (300 mg/L).

Em seguida foram isoladas colônias contendo o plasmídeo inserido e realizado uma extração plasmidial em média escala como descrito na seção 3.2.2.6.2 .

3.2.2.9 Processo de Transformação do pDAA2 em *Neisseria meningitidis* linhagem C2135

O plasmídeo pDAA2, contendo o gene a ser inativado *pilE* foi utilizado para realizar a recombinação homóloga. A linhagem de *Neisseria meningitidis* C2135, a ser transformada, foi inoculada por esgotamento em ágar chocolate e incubada como descrito anteriormente. Uma suspensão a $DO_{600nm} = 2,00$ ($\sim 1.10^9$ – UFC/mL), em meio BHI suplementado com 5mM de cloreto de magnésio, foi alíquotada em volumes de 100 µL em uma placa de cultivo celular de 24 orifícios. Alíquotas de volume superior a 5 µL contendo 5 µg do plasmídeo a ser transformado

foram adicionados a suspensão bacteriana, tomando-se o cuidado de se reservar uma alíquota a ser utilizada como controle negativo da transformação e que, também, foi utilizada para a determinação da frequência de transformação. O material foi incubado a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, adicionados, em cada alíquota, 900 µL de meio BHI suplementado com cloreto de magnésio. O processo de transformação ocorreu por mais 3 a 4 horas a 37°C. O volume total da transformação foi semeado em placa de ágar chocolate adicionada dos antibióticos de seleção do plasmídeo eritromicina (2 mg/L) . O material foi incubado a 37°C, em baixa tensão de O₂, durante 24-48 horas até o aparecimento das colônias visíveis (TAHA *et al.* 1998). Sendo assim obtivemos então a linhagem *N. meningitidis* C2135Δ *pilE* que foi testada posteriormente quanto à capacidade de transformação (que uma vez tendo *pilE* deletado tal processo não ocorre), utilizando uma concentração de 5µg de DNA genômico de M2 (Hollanda *et al.*, 2011) e selecionada em ágar chocolate contendo 40µg/mL de espectinomicina.

3.2.3 Método de extração da vesícula de membrana externa (OMV)

A extração da OMV foi realizada utilizando a metodologia de extração por ultrafiltração. As cepas utilizadas foram as linhagens *N. meningitidis* IAL 2443, *N. meningitidis* C2135 e *N. meningitidis* C2135Δ *pilE*. As mesmas foram crescidas previamente, como descrito na seção 3.2.1 e transferidas para garrafas de Roux contendo meio de cultura GC em seu interior. As colônias crescidas nas garrafas foram suspensas em PBS e posteriormente centrifugadas a 4000rpm/10 minutos.

O sobrenadante que resultou da centrifugação foi transferido e filtrado a vácuo através de uma membrana MILIPORE® com porosidade de 0,125 µm. O filtrado foi descartado e a membrana foi lavada com PBS. A membrana foi descartada e o PBS contendo OMVs foi

armazenado à -80°C . Para determinar o tempo ótimo de extração das vesículas foi realizada uma cinética da produção. Para tal, foram utilizadas quatro garrafas de Roux por cepa bacteriana. A extração de cada garrafa se deu após 8, 12, 16 e 24h, respectivamente, após inoculação.

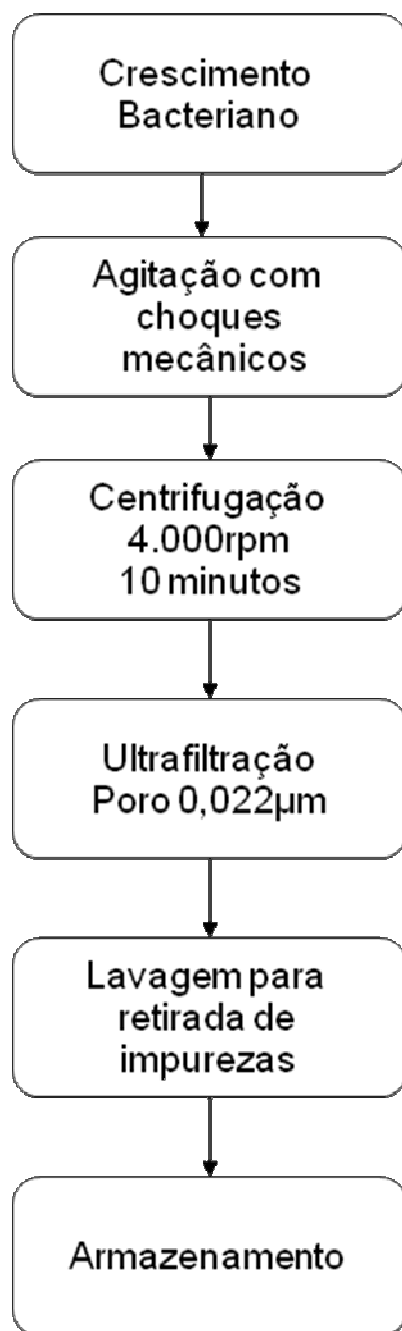


Figura 3. Fluxograma da extração por ultracentrifugação

3.2.4 Dosagem Protéica

Para determinar a concentração das OMVs obtidas, foi utilizada metodologia de Bradford (1976), utilizando o soro albumina bovina (BSA) como padrão. A mistura de reação foi composta por 100 μ L de extrato enzimático apropriadamente diluído e 1000 μ L da solução reagente. Após 15 min, as absorvâncias foram medidas a 595 nm, e os resultados foram expressos como mg de proteína por mL (mg/mL) ou mg totais (mg/mL x volume da amostra). Todos os resultados são a média das dosagens realizadas em triplicata.

3.2.5 Nanopartículas de Sílica mesoporosa

Foram utilizadas no presente trabalho dois tipos de nanopartículas de sílica mesoporosa denominadas SBA-15 e SBA-16, enviadas em colaboração com Dra. Edenésia Martins Barros de Sousa, do Centro de Desenvolvimento em Energia Nuclear de Belo Horizonte/MG. A sílica mesoporosa SBA-15 foi preparada de acordo com a metodologia descrita por Zhao et al. (1998) usando um copolímero tribloco Pluronic P123-PEO₂₀PPO₇₀-PEO₂₀ poli-[óxido de etileno]-poli[óxido de propileno]-poli[óxido de etileno] [EO₂₀PO₇₀EO₂₀] (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) como agente direcionador de estrutura. O copolímero P123 foi dissolvido em uma mistura de água destilada e HCl sob agitação, seguido pela adição tetraetil ortosilicato. A mistura foi mantida a 35 °C por 24 horas, e posteriormente por 1 dia à 100 °C sob condições estáticas em uma autoclave revestida por teflon. O material obtido foi filtrado e secado a 40 °C e o surfactante foi removido por calcinação por 550 °C por 5 horas. O SBA-16 foi sintetizado sob condições ácidas em uma faixa de concentração de 3% de Pluronic F127-EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆ (EO₁₀₆PO₇₀EO₁₀₆) diluído em temperatura ambiente. Após reagir por 20 horas foi obtido SBA-16

alto grau de pureza por aquecer o precipitado sólido da solução mãe a 80 °C por 2 dias, seguindo o protocolo Rivera-Muñoz *et al.*, 2010.

3.2.6 Imunização

O protocolo das imunizações foi aprovado pela CEUA- UNICAMP, Protocolo nº 2529-1 como mostra documento em anexo. Foram utilizadas fêmeas de *Swiss*, com de 4 semanas de idade, não isogênicos e com padrão sanitário adequado (SPF). Os animais foram separados em 4 grupos, sendo eles: controle (somente PBS); vacinados com OMV (1ug), OMV (1 ug) + nanotubo SBA-15 (250 ug) e OMV (1 ug) + nanotubo SB-16 (250 ug). As imunizações foram realizadas pela via intra-peritoneal, com duas doses, a primeira foi realizada no primeiro dia do experimento e a segunda dose no sétimo dia do experimento, segundo Zarantonelli *et al.*, 2006.

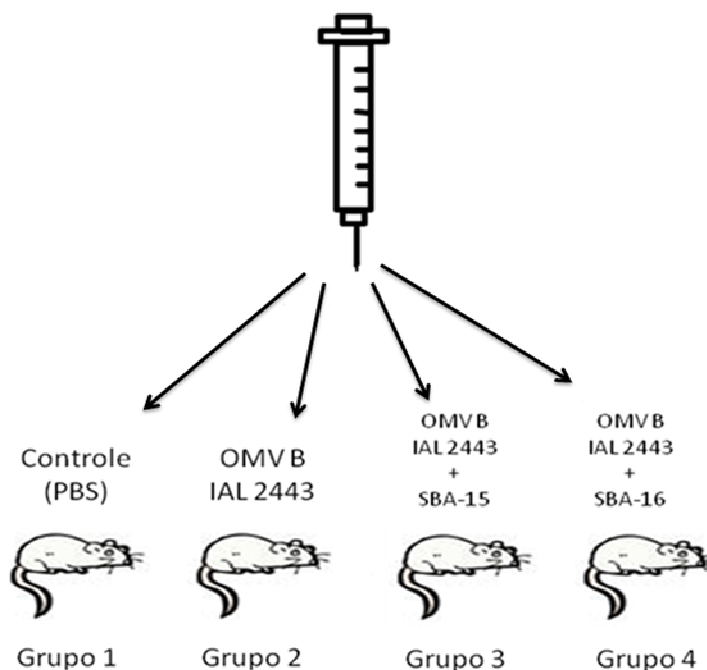


Figura 4. Modelo esquemático da imunização de camungongos fêmeas Swiss com OMV, OMV+SBA-15 e OMV+SBA-16.

Após três semanas do início da primeira imunização, foi coletado assepticamente o sangue total através do seio retro-orbital dos camundongos com auxílio de uma micropipeta e os animais foram sacrificados por técnica de deslocamento cervical (PECAUT, 2000). O sangue coletado foi transferido para um tubo tipo Eppendorf[®] e colocado na estufa à 37 °C por 30 minutos. Logo após o tubo permaneceu *over night* na geladeira a 4 °C. sendo logo após centrifugado a 4.000 RPM por 15 minutos e o soro obtido armazenado a 4 °C até sua utilização.

3.2.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A placa de 96 poços foi sensibilizada com antígenos bacterianos. Uma suspensão em tampão PBS da bactéria na concentração de 0,5 da Escala Mac Farland (1.10^8 UFC/mL) foi inativada à 56°C por 1 hora em banho maria, e adicionada 100 mL em cada well da placa, e incubado a 37°C por 24 horas. Em seguida, foi adicionado quantidade suficiente de soro do camundongo imunizado para obtenção do título 1:500 até a diluição seriada de 1:32.000 e incubados por 1 hora à 37 °C.

Logo após a placa foi lavada 3 vezes com tampão PBS. Como anticorpo secundário foi utilizado *Anti-IgG Mouse Whole Molecule (H+L)* para o soro dos camundongos imunizados e *Anti-IgG Human*, ambose conjugados à peroxidase, na diluição padronizada, e novamente incubado por 1 hora à 37 °C. Adicionou-se a solução reveladora bem como o substrato. A placa foi lida em espectrofotometro a 492 nm. A metodologia utilizada foi descrita por Sulahian *et al.* (1996).

3.2.8 Teste de Citotoxicidade Celular

3.2.8.1 Crescimento celular.

As células 3T3 e VERO foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), e mantidas à 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Após o crescimento celular, as células foram tripsinizadas, e transferidas para um placa de 96 poços, e incubada à 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂. Após o crescimento, foram adicionados OMVs, nanopartículas e misturas de OMV+nanopartículas. Para o controle positivo as células permaneceram somente com meio de manutenção e para controle negativo as células receberam privação total de nutrientes, a placa contendo as células em contato com as OMV e nanopartículas testadas foram incubadas por 48 horas à 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ (SCHUBERT-UNKMEIR et al. 2007).

3.2.8.2 Teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho- Neutro

O teste foi previamente descrito por BORENFREUND & PUERNER (1985). Após incubação das células com as OMV e nanopartículas, o meio foi removido e a cultura lavada com salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4. Para cada cavidade, foram adicionadas 0,2 mL de meio EAGLE contendo 50 µg/mL do corante Vermelho Neutro e a placa incubada por 3 h à 37°, para captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Após a incubação, o meio contendo o corante foi removido e as cavidades foram lavadas rapidamente com solução de formol-cálcio para remoção do corante não incorporado pelas células. Logo após, 0,2 mL de solução de etanol-ácido acético foram adicionados a cada cavidade e a placa foi mantida por 15 minutos. O corante foi quantificado em espectrofotômetro a 540 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 – Padronização da extração de OMV's e análise do efeito na produção de OMV's na cepa C2135 Δ *pilE*

Tendo em vista os objetivos deste trabalho iniciamos o estudo com a padronização da técnica de extração de OMV's através de ultrafiltração. Tal metodologia demonstrou grande eficácia na extração de OMV's de duas linhagens (C2135 e IAL B2443) de *N. meningitidis* e como mostra a figura 5 descrita a seguir:

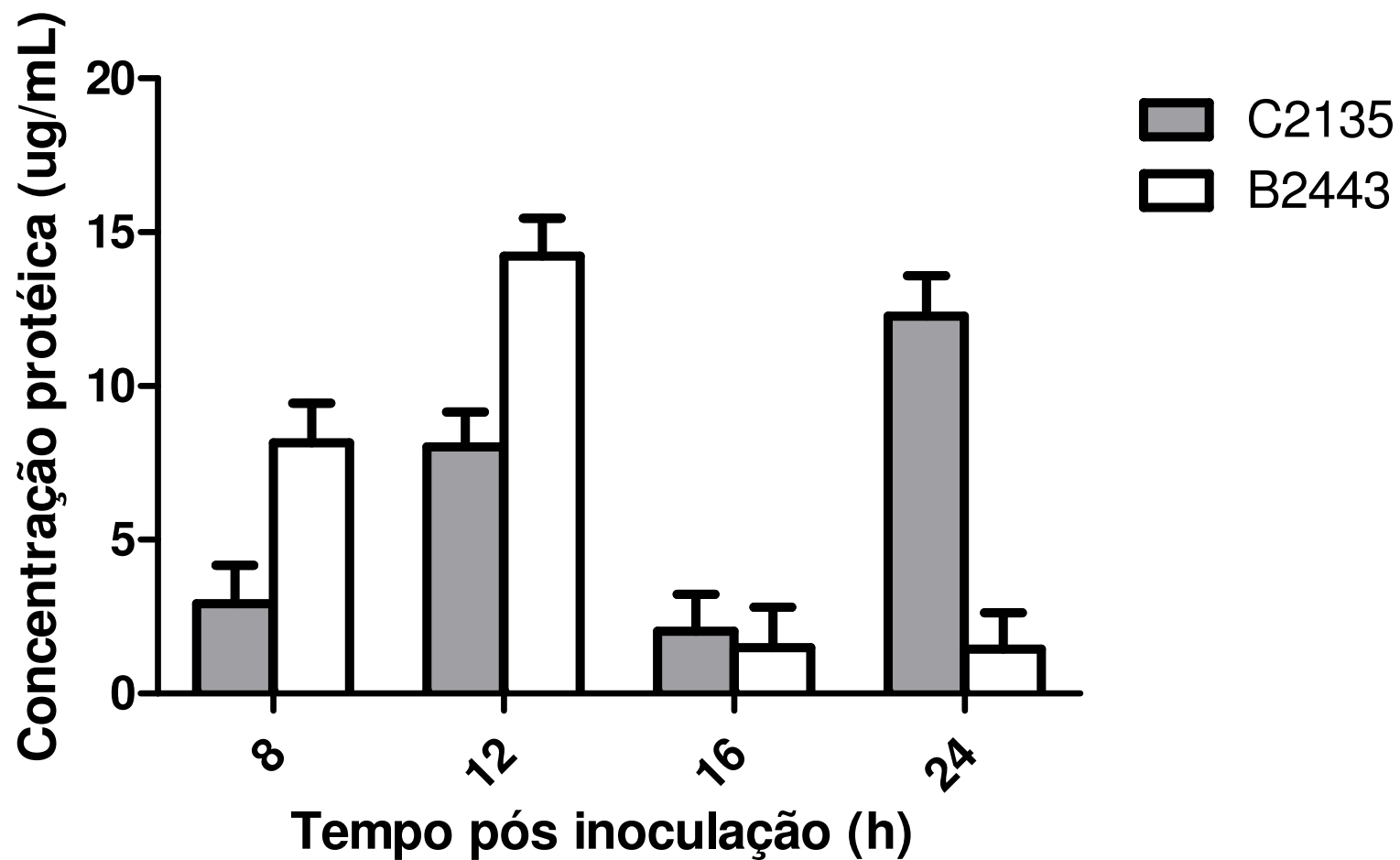


Figura 5. Concentração protéica ao longo do tempo após a inoculação das bactérias. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

C2135 e B2443 (cepas bacterianas de *N. meningitidis*).

Vale ressaltar, que a dosagem de OMV foi realizada pelo método de Bradford em que se determina a concentração protéica total presente nessas nanoestruturas. Contudo, os resultados da cinética da produção de vesículas de membrana externa, baseados nesse tipo de quantificação precorizada pela literatura (VAN DER LEY et al., 1991) mostraram que as cepas possuem diferentes tempos ótimos de produção (figura 5). Verificou-se que a cepa C2135 o tem seu momento ótimo de produção em 24h após a inoculação, e que para a cepa do sorogrupo B IAL2443 o ótimo é por volta de 12h.

Também, tais resultados demonstram a importância do processo de quantificação e da cinética na produção das OMV's na utilização de novas formas de fermentação em estado semi-sólido. Tal forma de fermentação é pouco utilizada para a produção de vacinas de origem bacteriana e é inédita na literatura para a obtenção de vesículas de membrana externa de *N. meningitidis*.

A opção por tal forma fermentativa, baseou-se na hipótese da interação na produção destas vesículas da superfície bacteriana com outras proteínas existentes nessa mesma região como, por exemplo, a pilina. Tendo em vista que as fímbrias bacterianas, como a pilina, geral são expressas em células imobilizadas ou em estado semi-sólido, os experimentos de extração de OMV's através da fermentação semi-sólida mostrou-se eficaz conseguindo-se concentrações de 12 à 15 µg/mL partindo-se de uma cultura em meio semi-sólido de 10mL de inóculo bacteriano inicial. Vale salientar, que tal metodologia utiliza de meios mais baratos e menos formulados que os descritos na literatura como o meio descrito por Tsolakos *et al.* (2011), em que utiliza de diversos componentes e etapas para o seu preparo que oneraria a produção final da vacina.

Além disso, a metodologia descrita na literatura, além de ser onerosa devido à utilização de meios complexos é realizada em meio líquido o que diminui a quantidade de OMV's produzidas, necessitando de uma fase de tratamento com detergentes para, de certa maneira, extrair da célula bacteriana uma quantidade considerável do material vacinal.

Do ponto de vista da extração das OMV's, optou-se por um método que também diminuiria os custos da produção desta nanoestrutura. Para isso, a ultrafiltração em membrana com poros de 0,125 μm (ou 125nm) se mostrou eficaz permitindo a substituição da ultracentrifugação. Tal etapa, dificulta o aumento de escala do processo de obtenção da OMV e também necessita do uso de detergentes e agentes tensoativos como extratores no processo, como geralmente é utilizado com o desoxicolato de sódio.

Desta forma, para verificar o efeito da interação destas proteínas de superfície do meningococo sobre a produção de OMV's procedeu-se a utilização de mutantes do gene *pilE*, responsável pela síntese da proteína estrutural da pilina desta bactéria. Tal proteína é o segundo fator de virulência em importância de *N. meningitidis* (sendo o primeiro o polissacarídeo capsular), que além de ser altamente imunogênica, está envolvida na colonização da bactéria em diversos pontos da meningítica (TAHA *et al.*, 1998; ALONSO *et al.*, 2003).

Utilizando a construção pDAA2 para a construção do mutante *knock-out* do gene *pilE* na cepa C2135 - mutante C2135 Δ *pilE*, obteve-se um mutante que teve sua capacidade de transformação completamente deletada quando submetida a transformação com o DNA genômico da linhagem M2 (que é deletado para o gene NMB0065 contendo o cassette para a deleção Ω aada de resistência a espectinomicina). Partindo dessa premissa, a análise da cinética para a obtenção das OMV deste mutante C2135 Δ *pilE* em comparação com a cepa selvagem C2135 foi

realizada e observou-se que houve um aumento significativo na produção de OMV no ponto 24 horas. (Figura 6)

Verificou-se, portanto, um aumento na concentração de OMV's utilizando a cepa mutada para o gene *pilE*. Todavia, outros genes codificantes de proteínas de superfície e/ou outros determinantes antigênicos como LOS e cápsula, estão sendo avaliados pela equipe para a verificação de sua influência no processo de obtenção das OMV. No momento, tais resultados revelam que existem uma influência de mutações pontuais na produção de proteínas de superfície, especificamente da proteína pilina, leva a modificações na obtenção de OMV. Ainda assim, tais resultados sugerem novas aplicações das OMV's. Para isso as OMV's podem ser utilizadas como possíveis carreadores de antígenos heterólogos, ou seja, provenientes de outras bactérias já que o meningococo é facilmente transformável e as OMV's facilmente extraídas. Entretanto, maiores estudos para verificar a possibilidade de fusão transcricional de proteínas heterólogas a genes controlados por promotores fortes no meningococo (como os promotores do gene *pilE* (TAHA *et al.*, 1998), devem ser feitos e já foram iniciados pelo grupo.

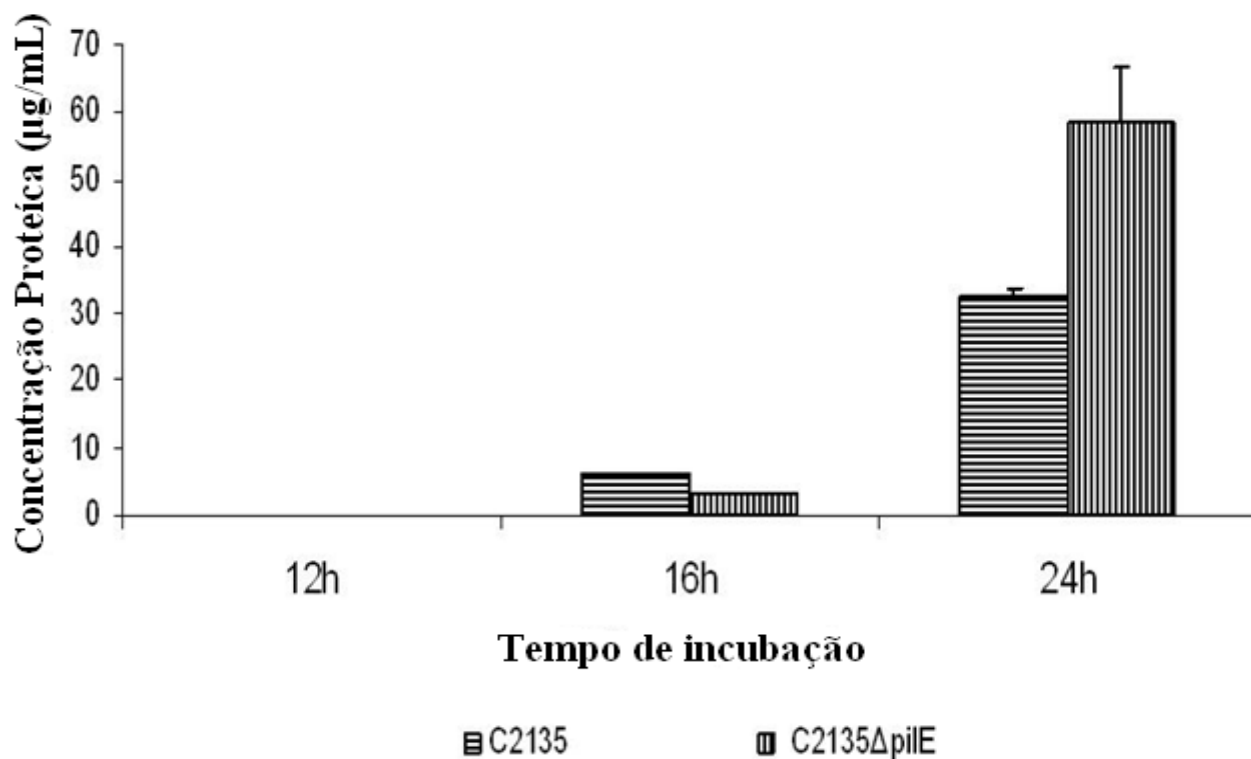


Figura 6. Concentração protéica ao longo do tempo após a inoculação das bactérias. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C2135 e C2135 Δ *pilE*.

4.2 Análise por ELISA do soro dos camundongos imunizados com OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 com e sem associação das nanopartículas SBA-15 e SBA-16.

A análise do reconhecimento de anticorpos produzidos através de imunizações em camundongos não isogênicos Swiss, utilizando o soro dos camundongos imunizados com OMV de *N. meningitidis* IAL 2443, OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 associado à nanopartícula SBA-15 e OMV da cepa IAL 2443 e SBA-16 em diluições de títulos de anticorpos de 1:500 até 1:32.000 frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* IAL 2443 demonstrou o reconhecimento destes soros à esta cepa bacteriana.

A figura 7 demonstra a eficiência no processo de extração das OMV utilizando a metodologia de ultracentrifugação, bem como a propriedade imunogênica destas partículas, mostrando que este método pode ser empregado para extração de vesícula de membrana externa de outras cepas de *N. meningitidis*.

Também, observou-se nesse experimento e nos que se seguem, um aumento do reconhecimento das cepas alvo do *coating* bacteriano, quando da utilização das nanopartículas de sílica como adjuvantes na dosagem de 250 µg por animal. Este fenômeno ocorre tanto para o uso adjuvante da sílica mesoporosa SBA-15, quanto para a sílica mesoporosa SBA-16.

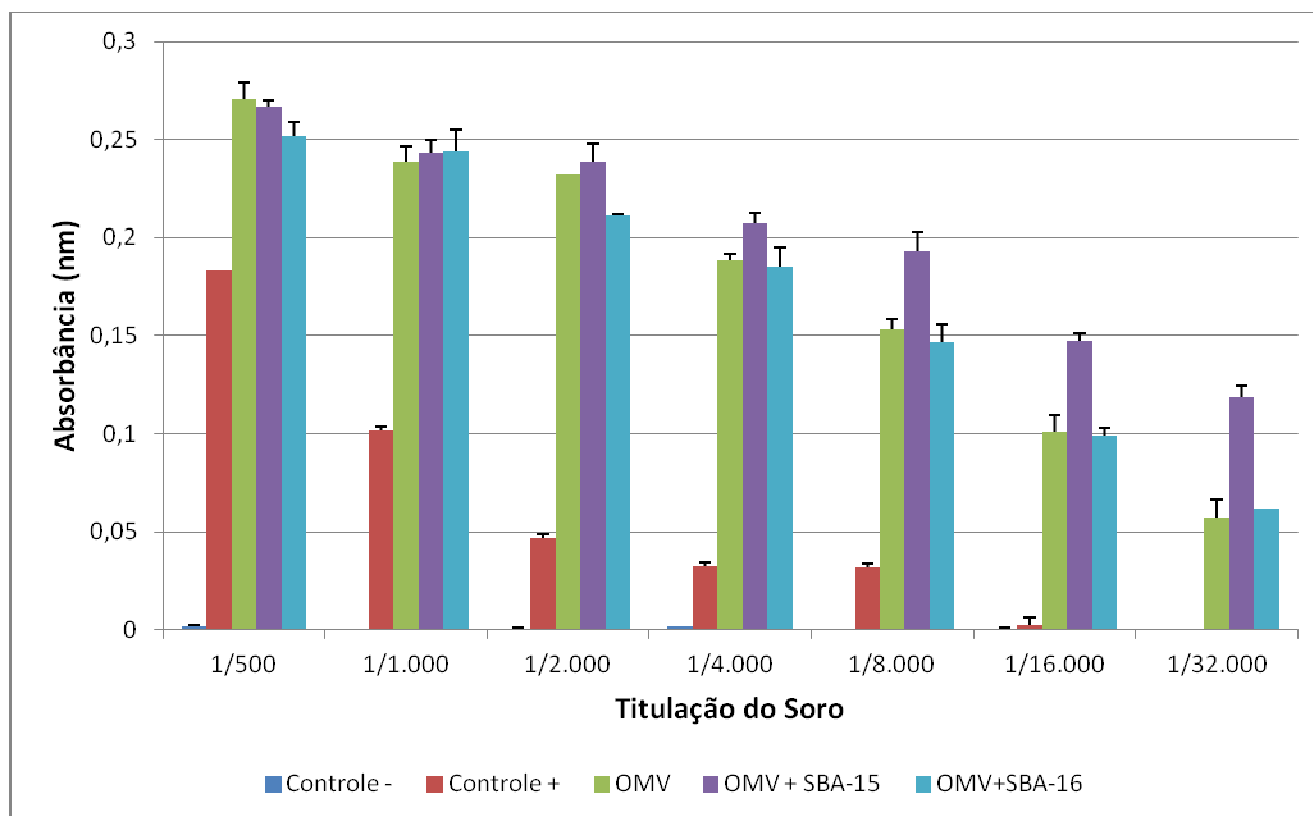


Figura 7. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* IAL 2443 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

Através do teste estatístico *Tukey's test one way*, foi avaliado o aumento significativo da associação da OMV IAL 2443 com as nanopartículas SBA-15 e SBA-16 frente ao *coating* bacteriano IAL 2443, os valores das análises encontram-se em anexo. Os resultados estão demonstrados nas figuras 8.

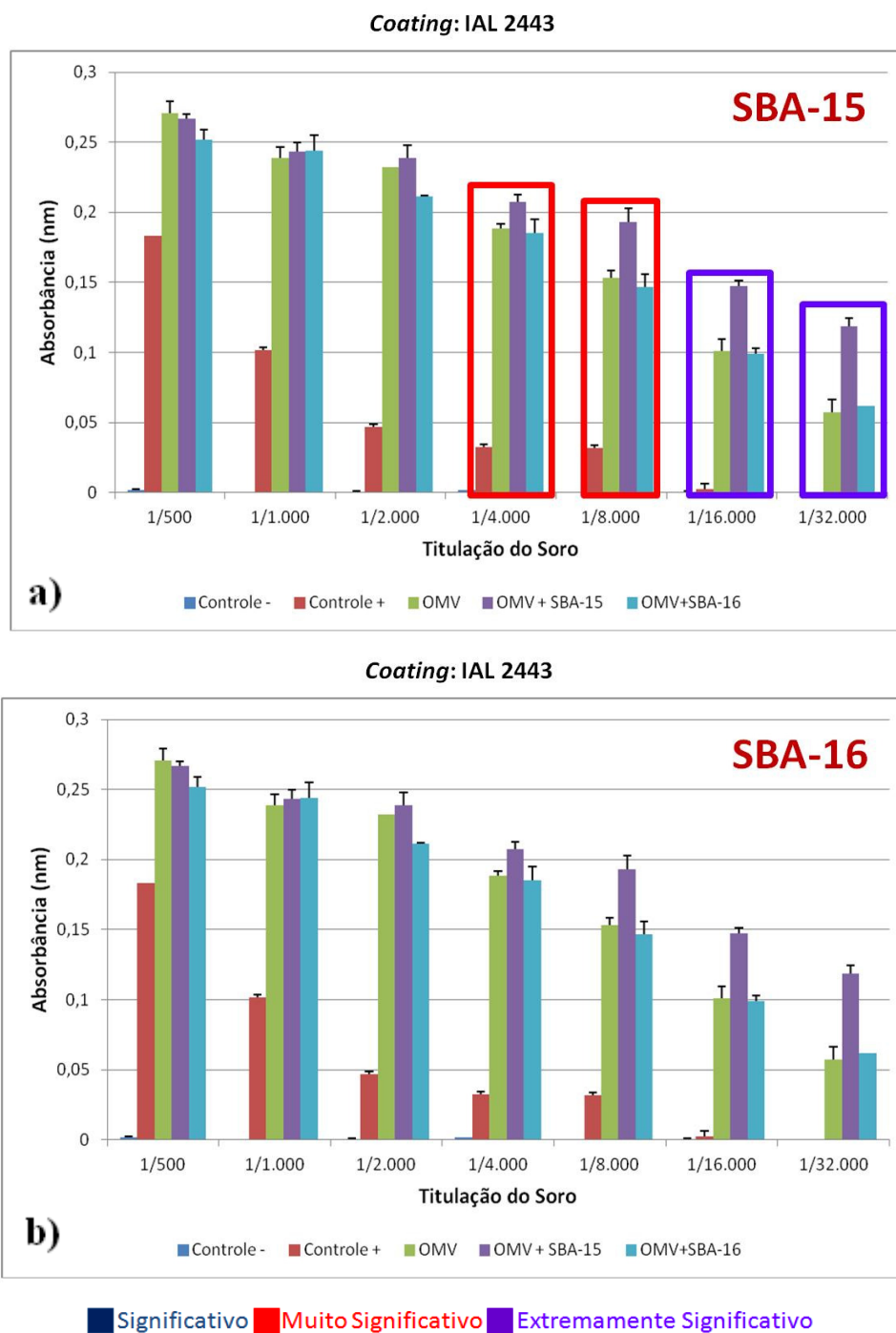


Figura 8. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano IAL 2443.

Verifica-se na figura 8 um aumento no reconhecimento da cepa utilizada com produtora da OMV quando da utilização das nanopartículas de sílica SBA-15. Salienta-se o fato destas nanoestruturas de sílica possuírem formas distintas e diferentes preparações químicas como podemos verificar nas figuras do artigo de HOLLANDA *et al.* (2011) realizado em colaboração com a Dra. Edésia Barros Martins de Sousa do Centro Nacional de Energia Nuclear – CNEN, de Belo Horizonte. Também, observa-se que a SBA-15 possui um aspecto tubular enquanto que a SBA-16 uma forma esférica. Possivelmente, frente ao sistema imunológico, tais nanoestruturas provocam reconhecimentos distintos de células apresentadoras de antígenos com conseqüente diferença na formação da memória imunológica e na vacinação como um todo.

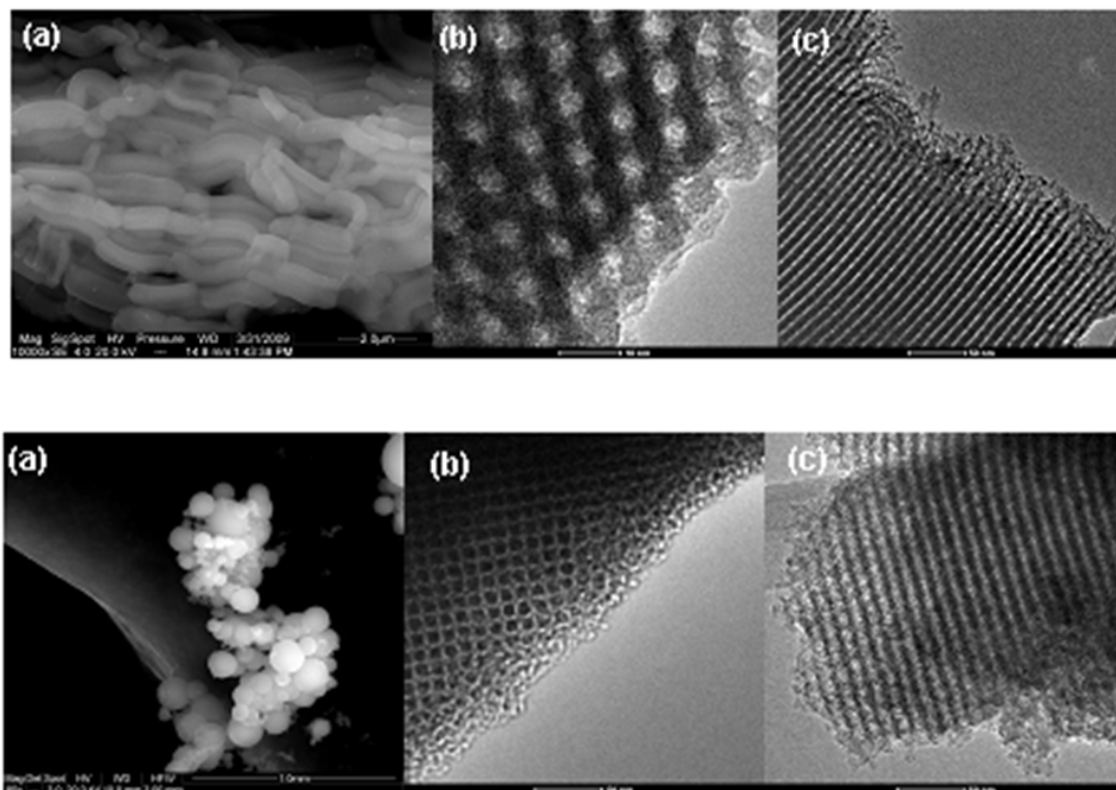


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura das sílicas mesoporosas SBA-15 (a -superior) e SBA-16 (a - inferior). Microscopia eletrônica de transmissão vista superior dos poros de SBA-15 (b – superior) e

SBA-16 (b- inferior), também visualização perpendicular desses poros do SBA- 15 (c- superior) e SBA-16 (c- inferior) (HOLLANDA *et al.*, 2011).

Contudo, tais aspectos imunológicos mais profundos precisam ser elucidados em estudos futuros. Cabe mencionar que o uso de SBA- 15 como adjuvantes para vacinas virais contra hepatite B já está sendo utilizado e possui seu uso protegido por uma patente depositada por pesquisadores da Universidade de São Paulo em parceria com o Laboratório Cristália, recebendo o número de registro nacional PI-0503817-0 e número WO 07030901 como registro internacional (CARVALHO *et al.* 2010). Todavia a utilização da sílica mesoporosa SBA- 16 é inédito e possivelmente passível ao depósito de patente para a utilização específica com o intuito de adjuvante vacinal.

4.3 Análise por ELISA do soro dos camundongos imunizados com OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 com e sem associação das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 frente a outras linhagens de meningococo.

Foram realizados ensaios para a verificação do reconhecimento de anticorpos dos camundongos imunizados com OMV da cepa IAL2443, adjuvadas com SBA-15 e SBA-16 frente a diferentes linhagens de meningococo. Tal análise, objetiva verificar o aumento do reconhecimento de epítomos bacterianos em outras linhagens bacterianas de diferentes sorogrupos e características genotípicas partindo de uma imunização com uma única cepa.

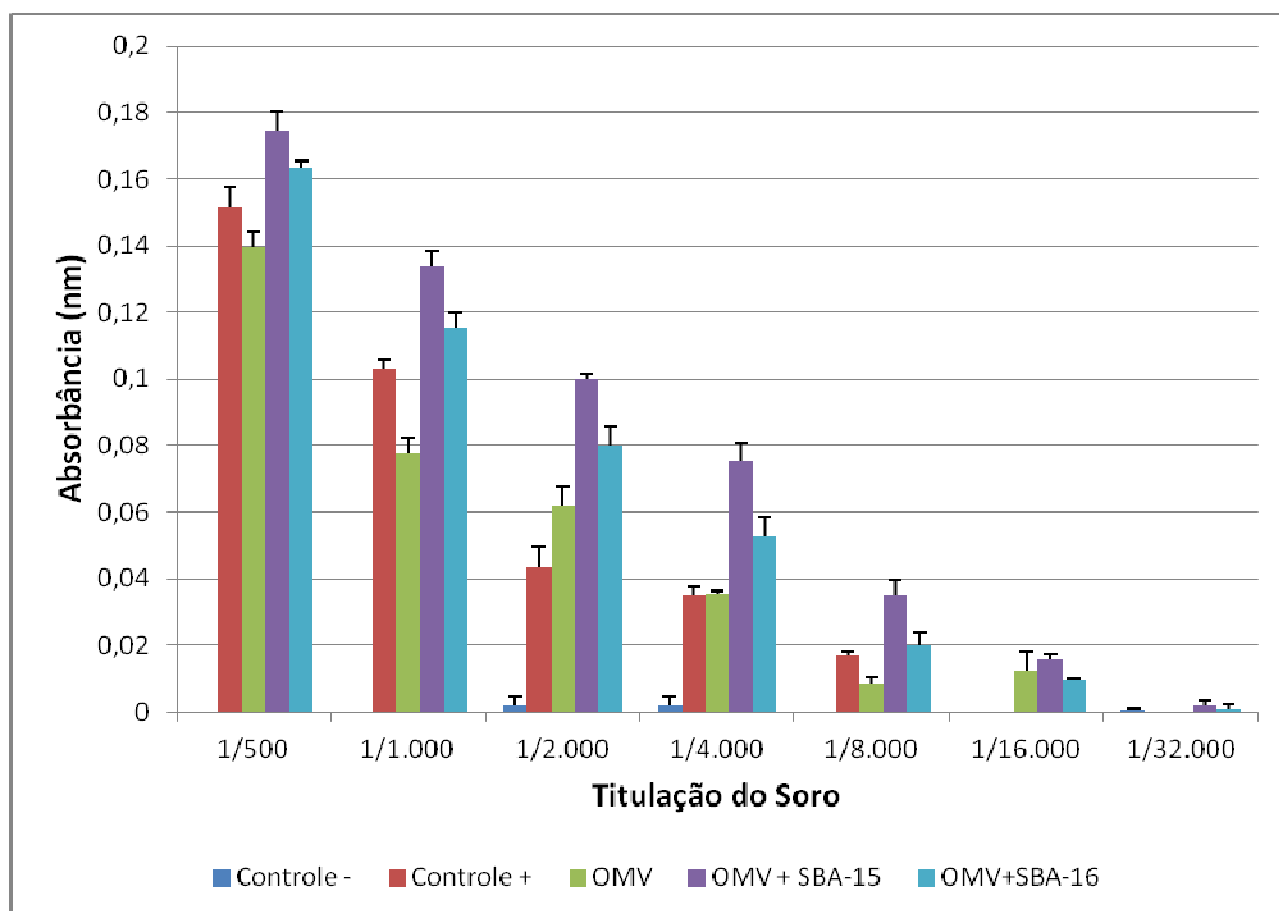


Figura 10. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* B4 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

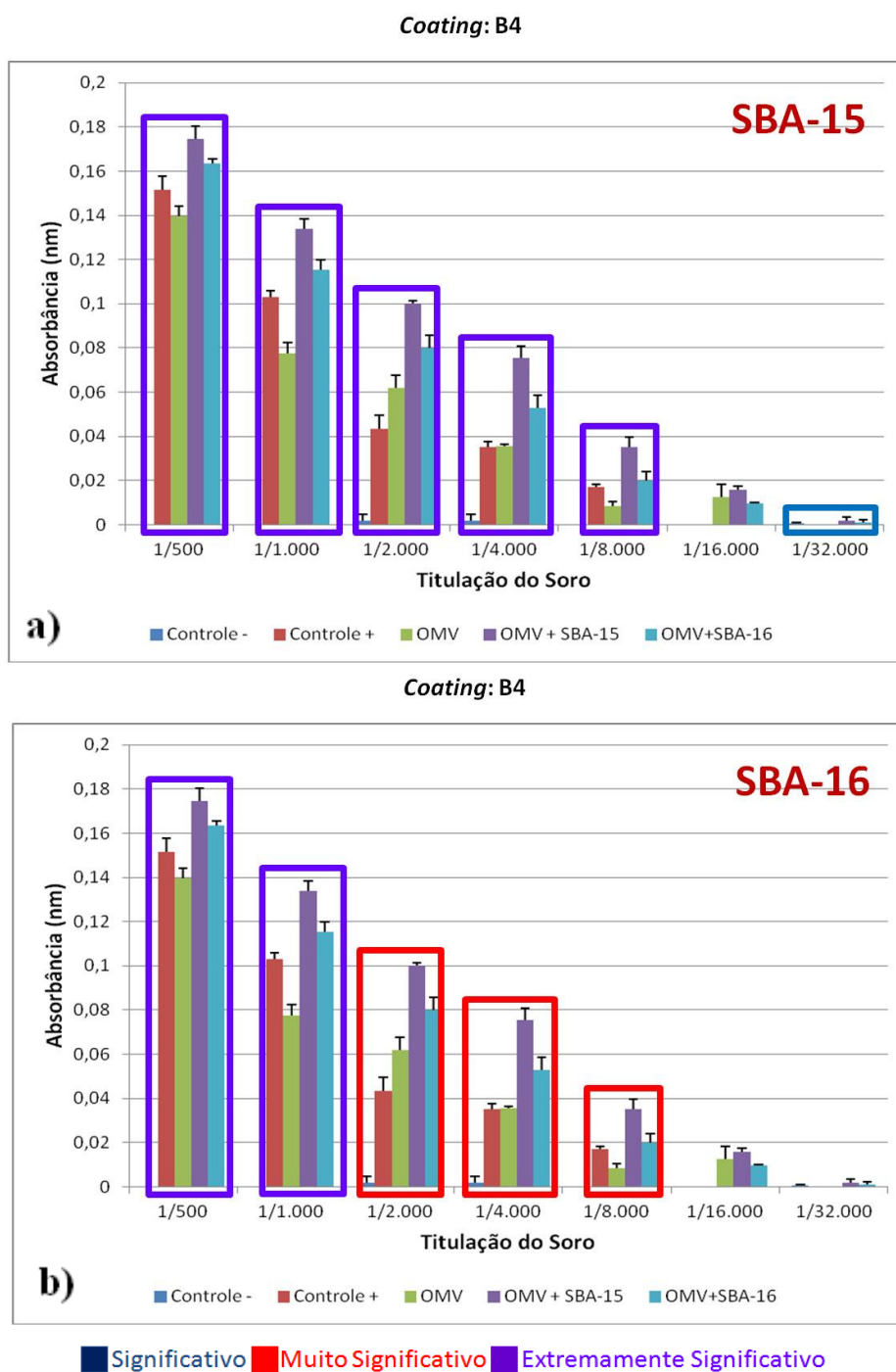


Figura 11. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano B4.

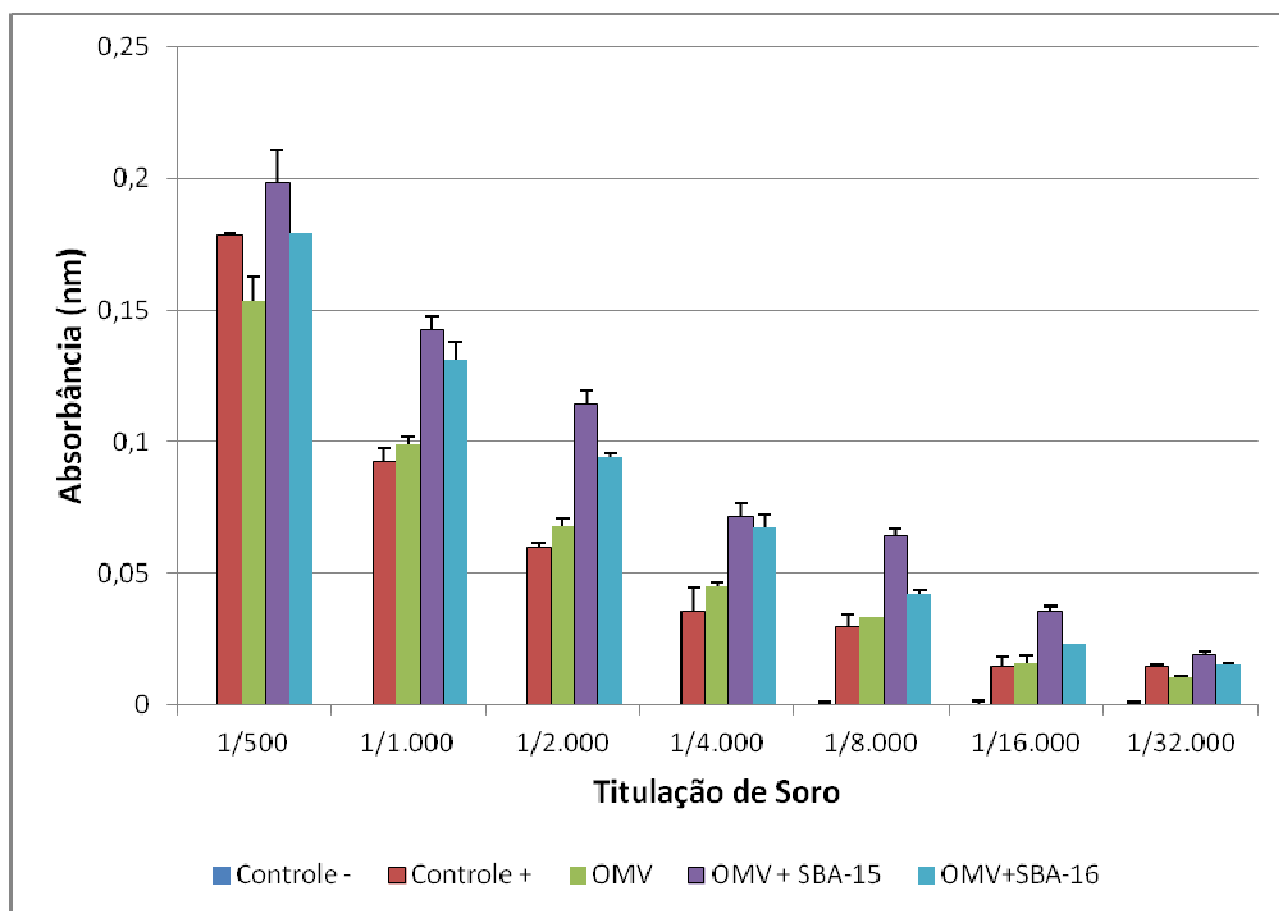


Figura 12. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* P2354 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

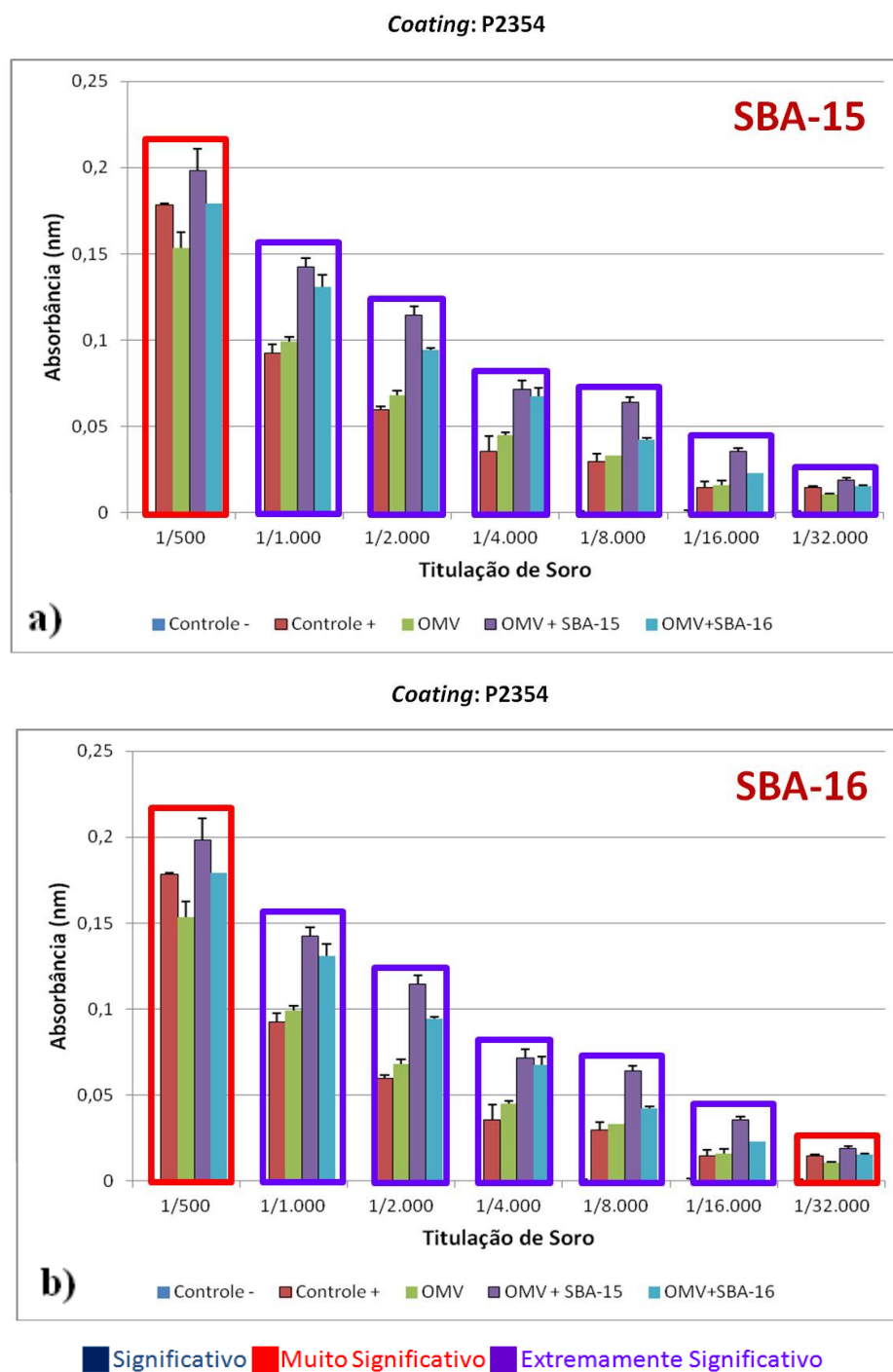


Figura 13. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano P2354.

As linhagens de *N. meningitidis* B4 e *N. meningitidis* P2354 pertencem ao sorogrupo B, bem como a cepa de *N. meningitidis* IAL 2443. A figura 10 mostra que houve uma resposta imunológica frente ao *coating* bacteriano da cepa *N. meningitidis* B4 a partir da imunização com a cepa IAL 2443. Quando a imunização foi associada às nanopartículas SBA-15 e SBA-16 ocorreu um aumento significativo da resposta imunológica (ver tabelas em anexo e figura 11). A associação com o SBA-15 se mostrou mais eficaz em relação ao SBA-16. A figura 12 mostra que houve uma resposta imunológica frente ao *coating* bacteriano da cepa *N. meningitidis* P2354 a partir da imunização com a cepa IAL 2443. Quando a imunização foi associada às nanopartículas SBA-15 e SBA-16 ocorreu um aumento significativo da resposta imunológica entre as diluições 1:500 até 1:16.000. A associação com o SBA-15 se mostrou mais eficaz em relação ao SBA-16 (ver figura 13).

A *N. meningitidis* linhagem IAL 2443 tem seu polissacarídeo capsular classificado no sorogrupo B, segundo BORROW *et al.* (2005), devido à presença da molécula de ácido α -2,8-N-acetil neuramínico muito similar ao ácido siálico humano que está presente na cápsula do sorogrupo B, as vacinas existentes não são tão efetivas. Uma solução para este problema é a inclusão de adjuvantes farmacêuticos que aumentariam a resposta imunológica do hospedeiro frente ao antígeno vacinal presente na vacina. Neste contexto, a associação com nanopartícula de sílica mesoporosa como adjuvante para vacinas baseadas em OMV de *N. meningitidis* sorogrupo B se mostra muito promissora.

Já a análise por ELISA do soro dos camundongos imunizados com OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 com e sem associação das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 frente ao *coating*

bacteriano de *N. meningitidis* C2135, *N. meningitidis* P2143 e *N. meningitidis* Y USA, linhagens não pertencentes ao sorogrupo B pode ser vista nas figuras 14, 16 e 18 que seguem:

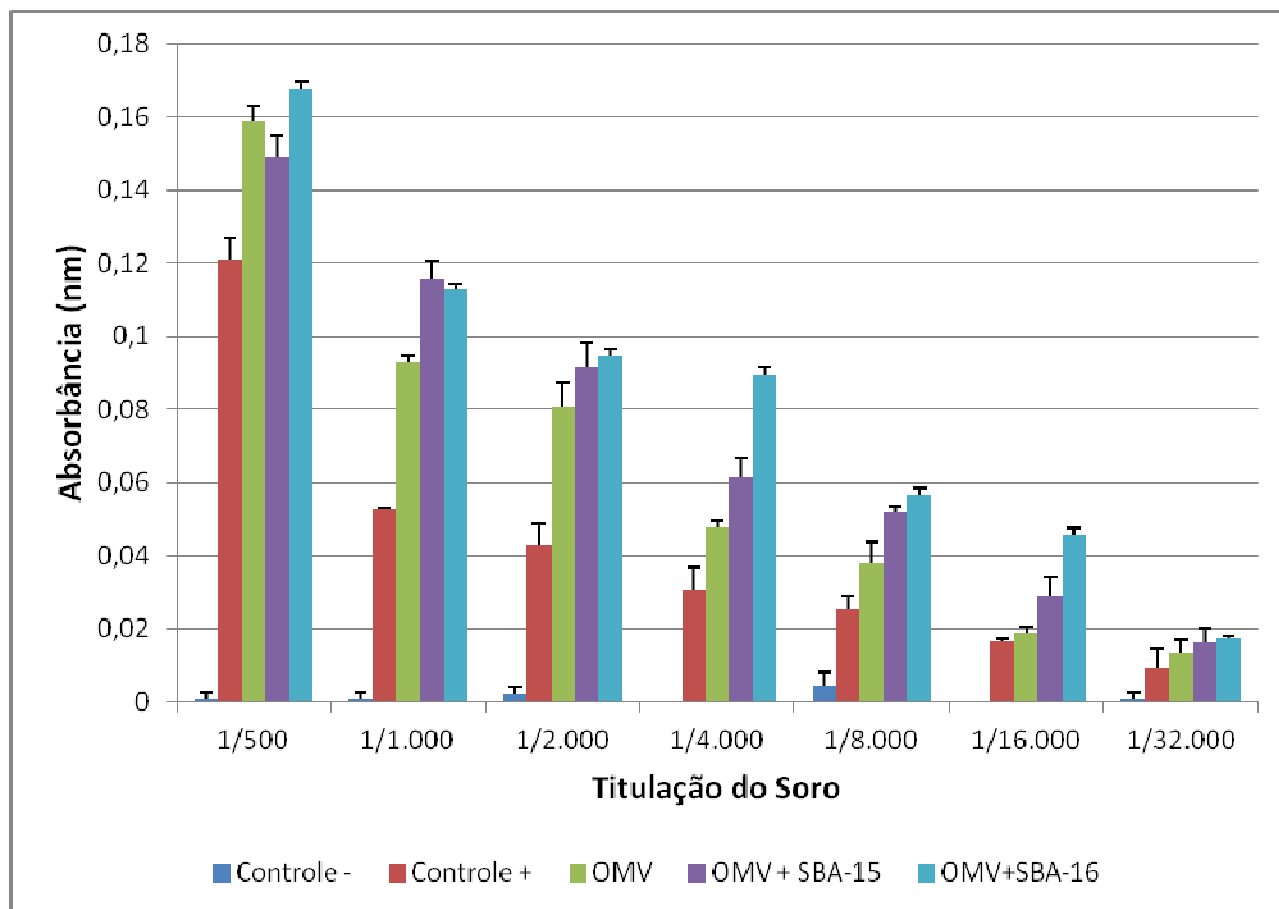


Figura 14. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* C2135 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

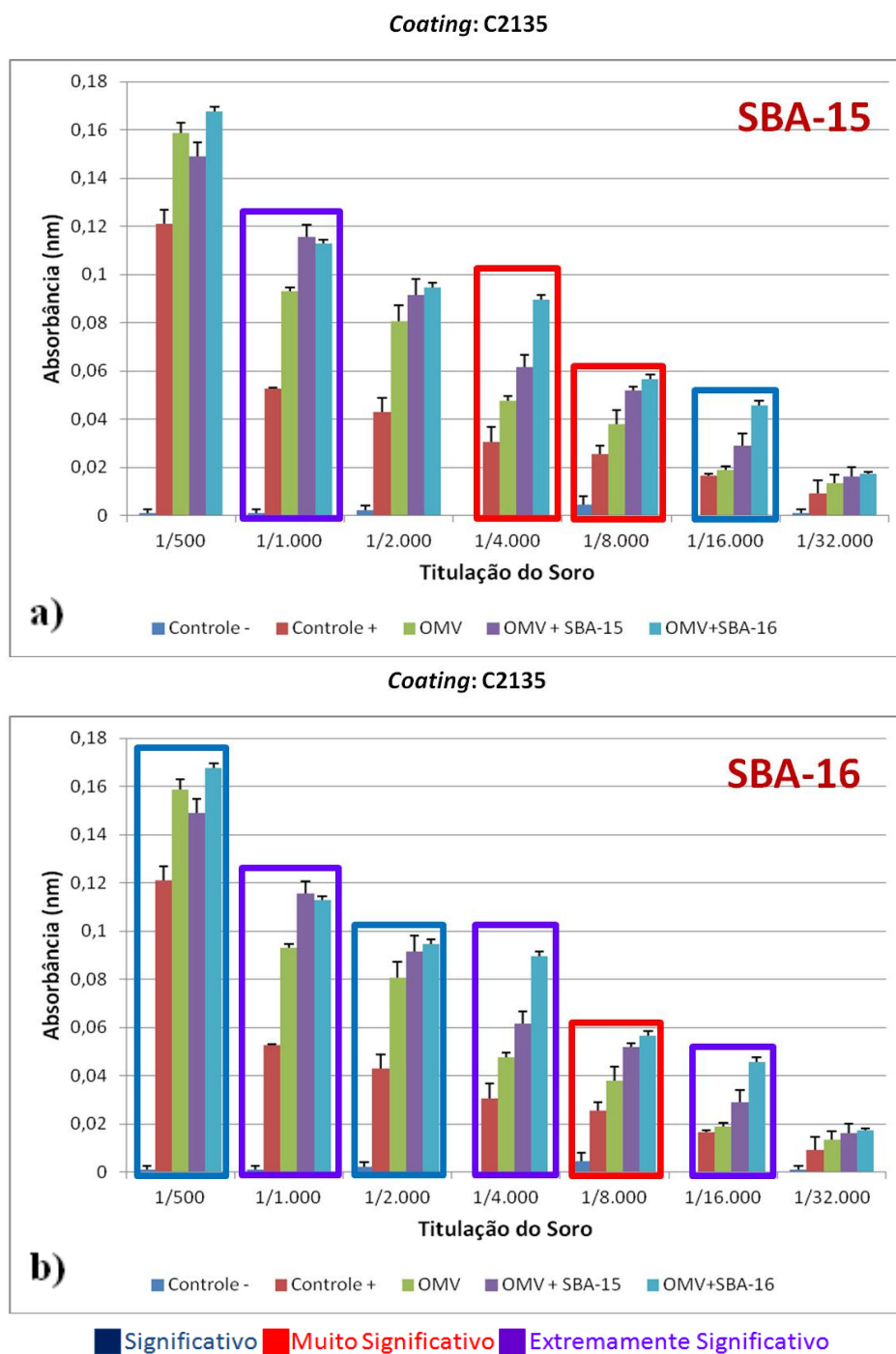


Figura 15. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano C2135.

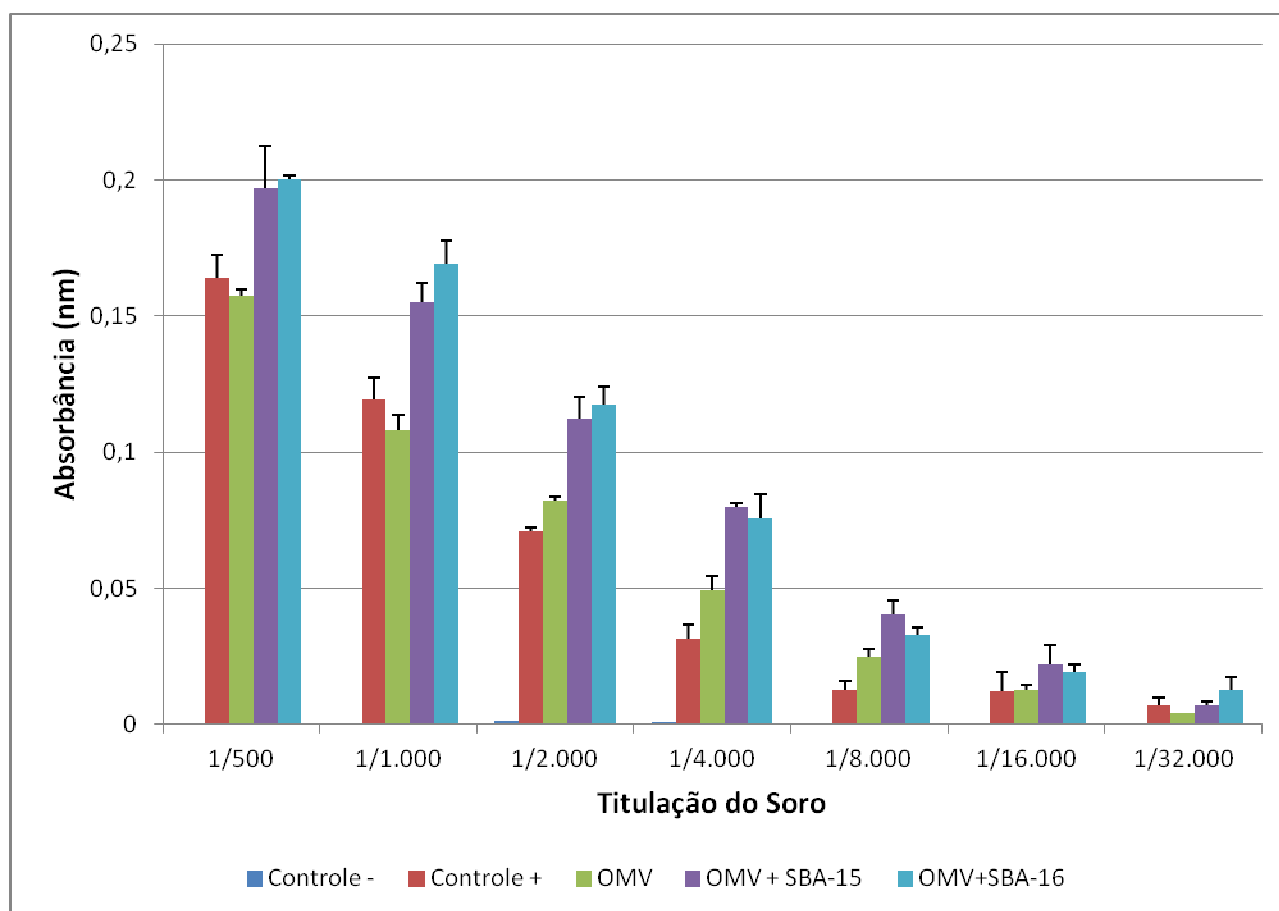


Figura 16. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* P2143 utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

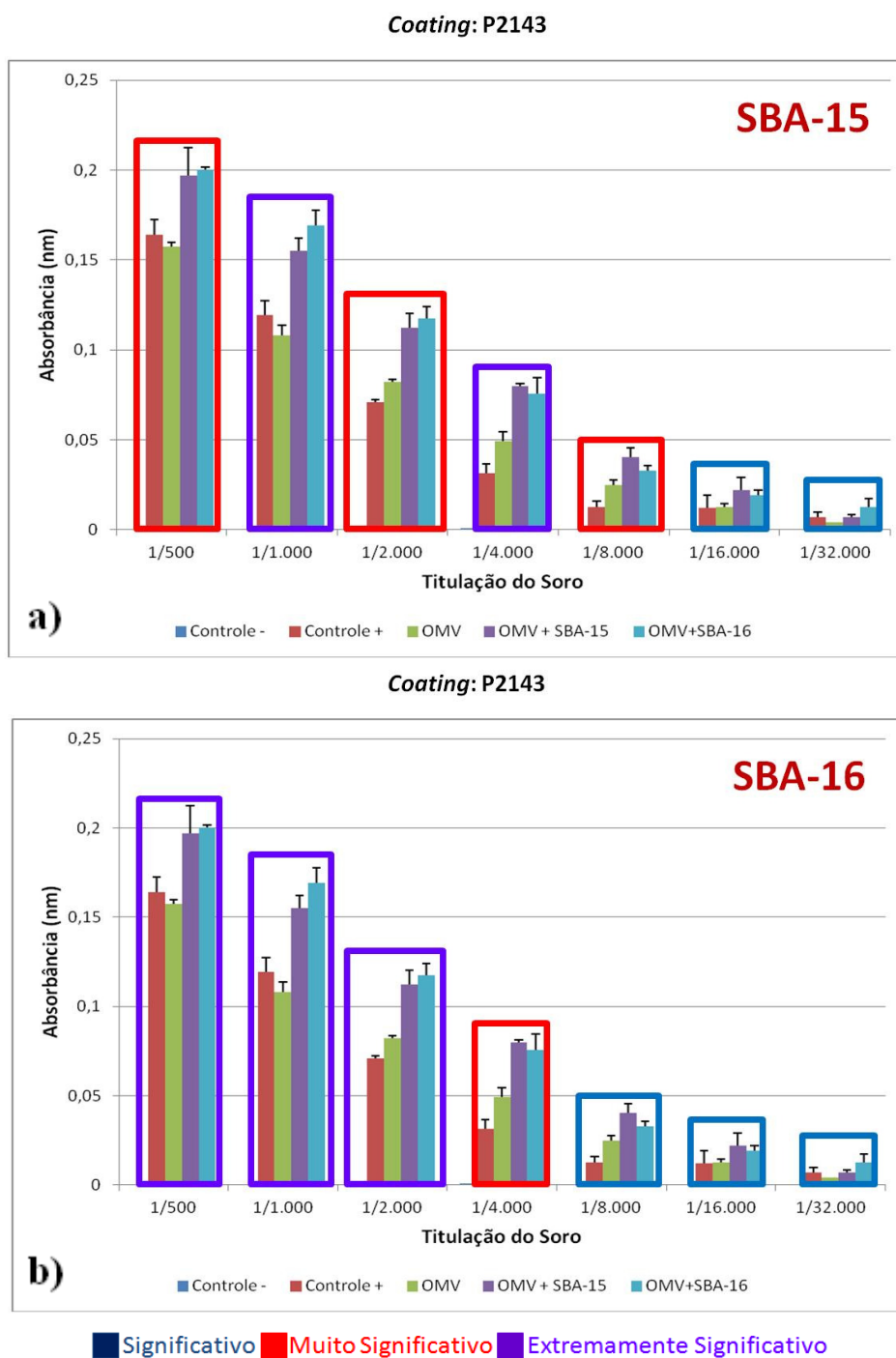


Figura 17. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano P2143.

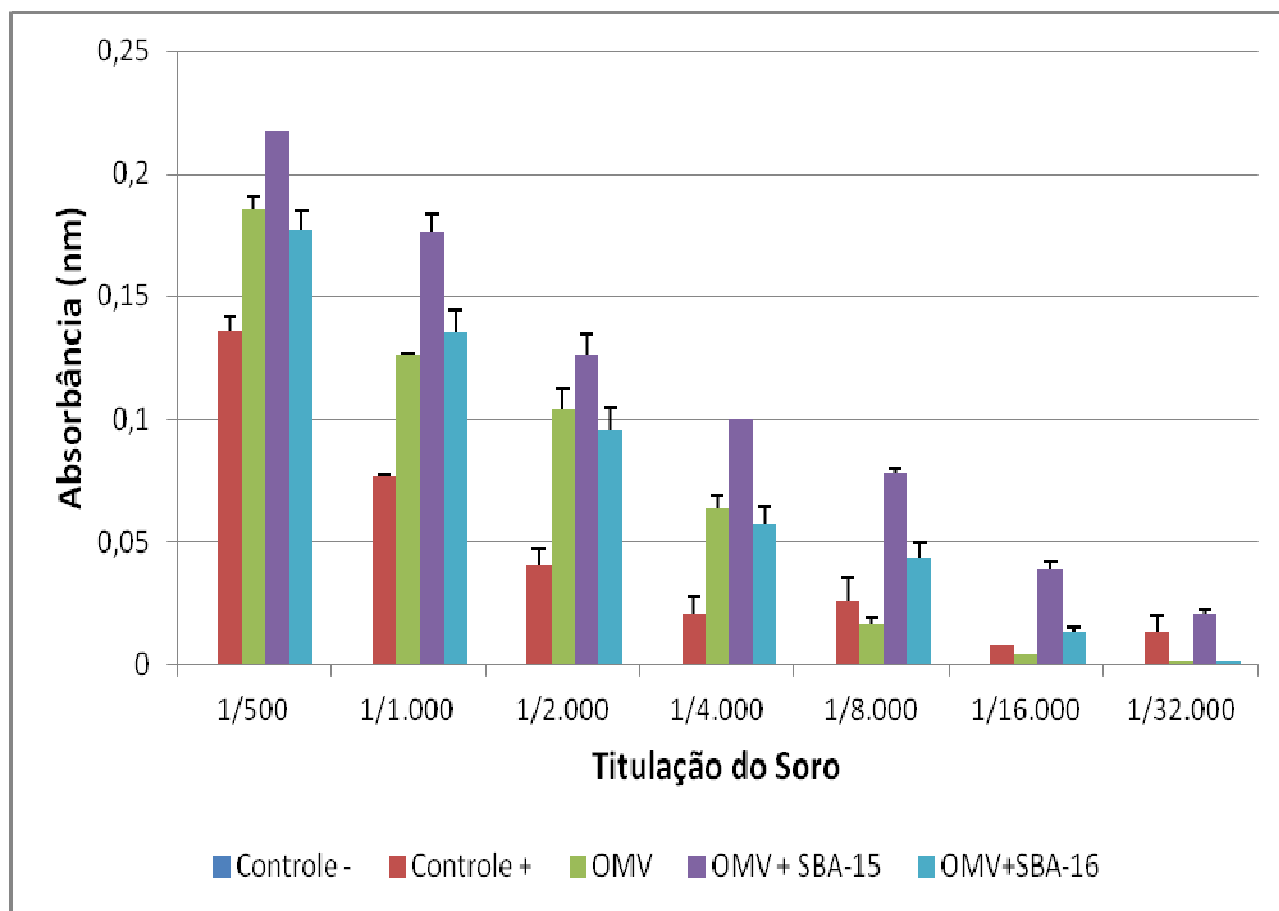


Figura 18. Análise do reconhecimento do soro de camundongo imunizado frente ao *coating* bacteriano de *N. meningitidis* Y USA utilizando a metodologia de ELISA. Valores expressos em média \pm desvio padrão. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano contendo anticorpos para a bactéria), OMV (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis*), OMV+SBA-15 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-15) e OMV+SBA-16 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa IAL 2443 de *N. meningitidis* associado a nanopartícula SBA-16).

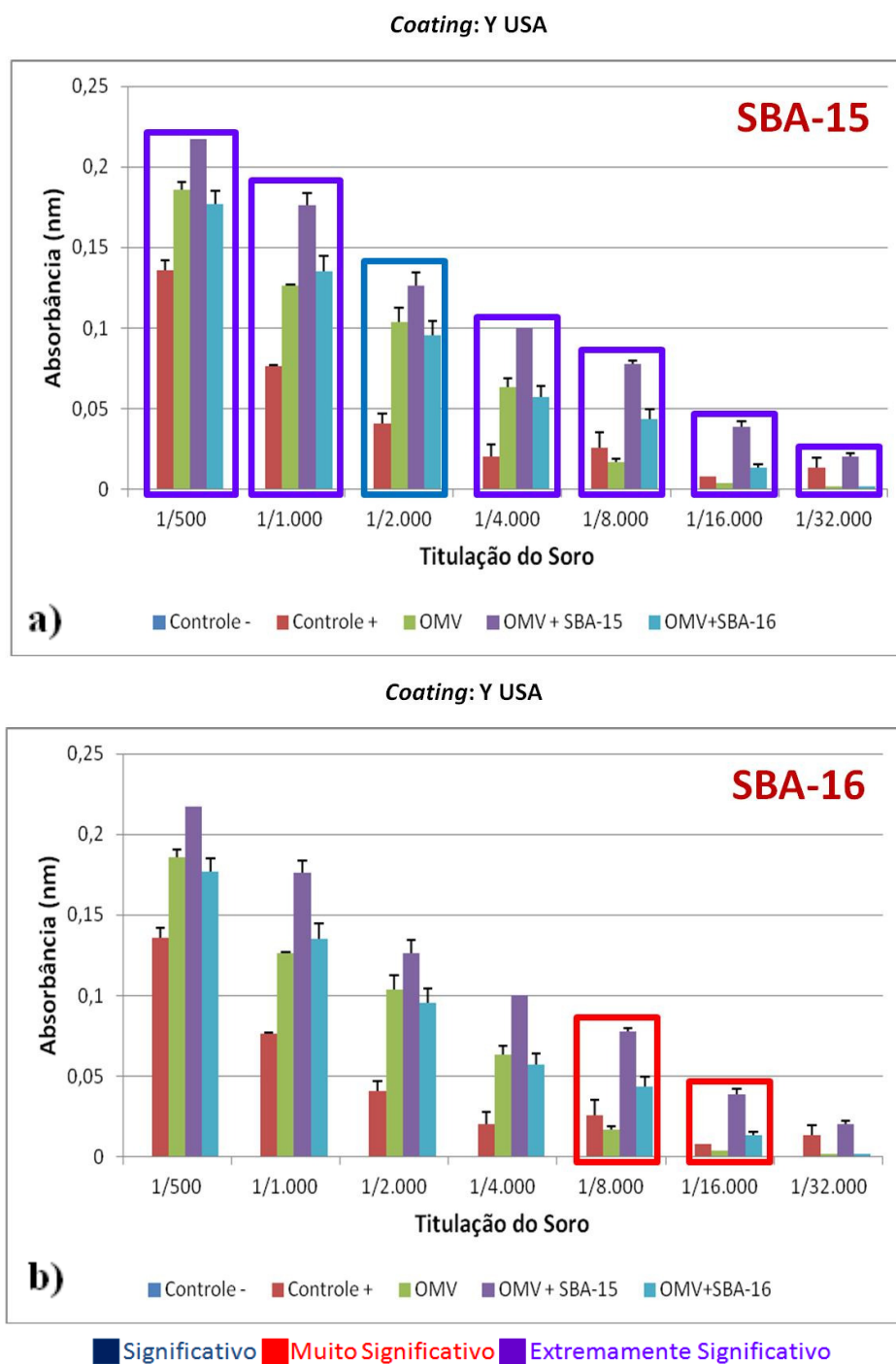


Figura 19. Análise estatística *Tukey's test one way* da comparação da OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-15 (a) e OMV IAL 2443 com OMV IAL 2443 associada com SBA-16 (b) frente ao *coating* bacteriano Y USA.

Analisando-se esses resultados verifica-se que ocorre o reconhecimento dos soros de animais imunizados com a OMV da cepa IAL 2443 frente a linhagens não pertencentes ao sorogrupo B e também, cepas de *N. meningitidis* de outros sorogrupos e apresentando diferentes genéticas significativas como as linhagens C2135 e P2143 ambas pertencentes ao sorogrupo C e a linhagem Y USA, pertencente ao sorogrupo Y. Observando as figuras acima verificou-se que houve um reconhecimento dos anticorpos presentes nos soros de animais vacinados com as preparações OMV, OMVcom SBA- 15 e OMV com SBA-16 como observados nas figuras 15, 17 e 19.

Quanto a capacidade adjuvante das nanopartículas de sílica, em especial SBA-16, promoveu o reconhecimento de linhagens do sorogrupo C (P2143 e C2135) apresentando valores de absorvância significativamente maiores quando comparadas às imunizações realizadas com as OMV's provenientes da cepa IAL 2443. Tal reconhecimento fica claro e significativo ($P < 0,05$) para diversos títulos de soros, em que se observa um maior reconhecimento das linhagens não utilizadas como cepas vacinais, mas que podem ser reconhecidas por tais anticorpos mediante a ação de sílica mesoporosa SBA- 15 e SBA- 16.

Sobre a inocuidade dessas preparações verificou-se a citotoxicidade dos compostos frente à células cultivadas *in vitro*. As figuras 20 à 23 demonstram baixa ou nenhuma citotoxicidade das preparações seja somente as nanopartículas de sílica mesoporosa (figuras 20 e 22) seja na mistura das OMV's e esas nano partículas (figuras 21 e 23). Altas concentrações de SBA- 16 demonstrou uma sobrevivência celular de cerca de 70% quando utilizada sozinha sobre as células VERO (figura 22). Contudo, quando da adição dessas nanopartículas às OMVs essa citotoxicidade é

menor (cerca de 95% o que a torna mais aceitável do ponto de vista citotóxico) o que indica que tal preparação pode ser utilizada como adjuvantes vacinais.

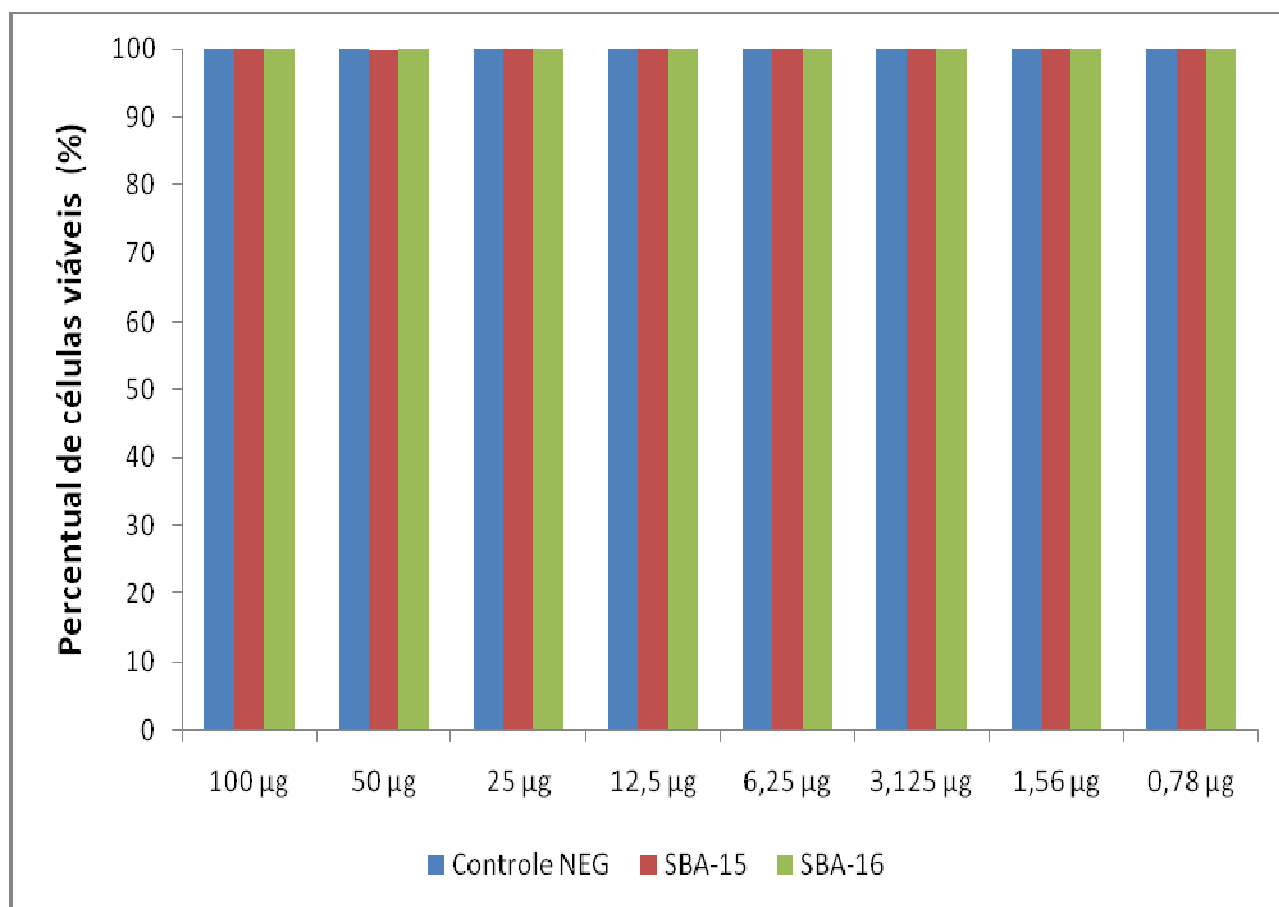


Figura 20. Teste de citotoxicidade celular das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 em diferentes concentrações frente à célula 3T3 utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

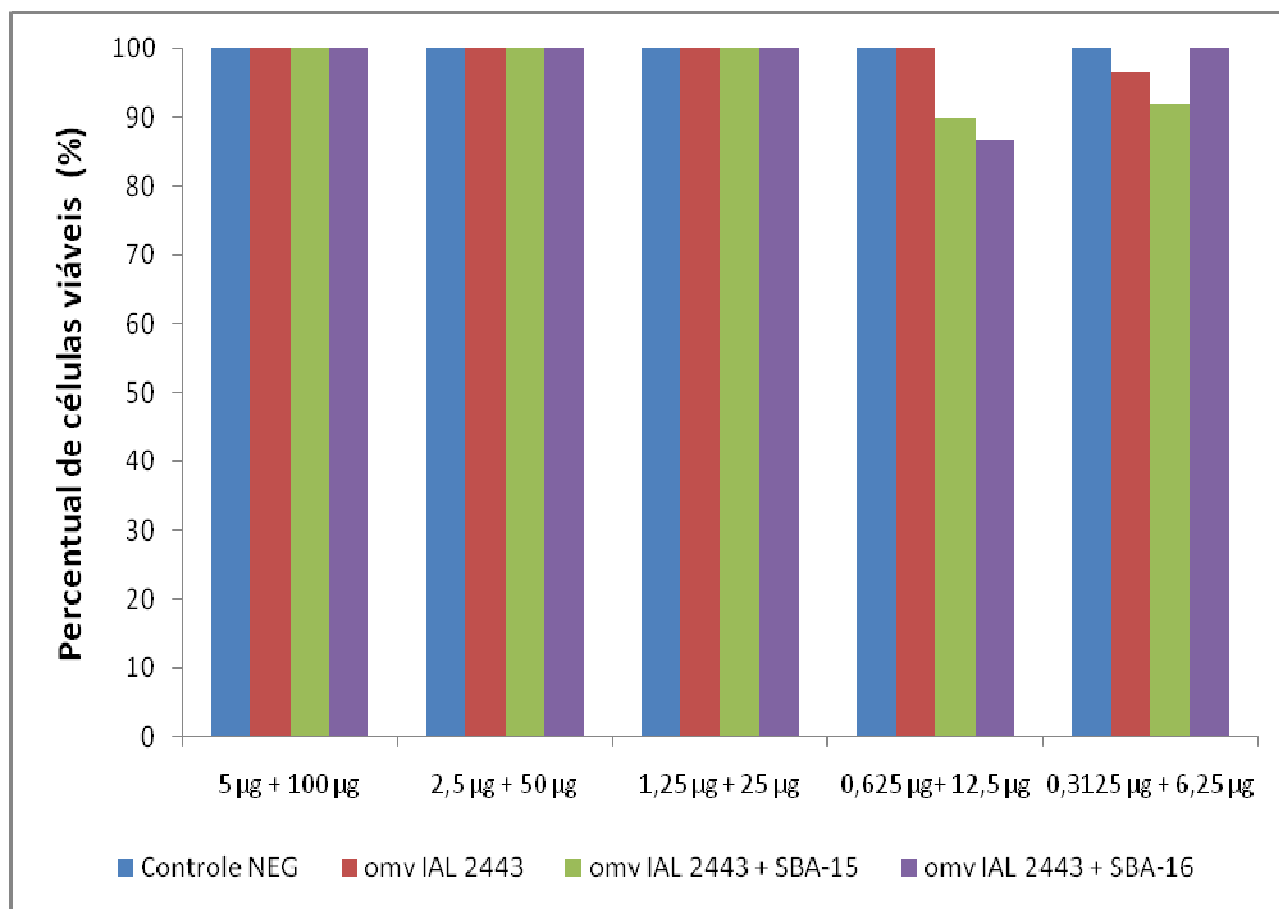


Figura 21. Teste de citotoxicidade celular da OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 (omv IAL 2443) isolada e OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 associadas com a nanopartículas SBA-15 (omv IAL 2443 + SBA-15) e SBA-16 (omv IAL 2443 + SBA-16) em diferentes concentrações frente a célula VERO utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

*Para o grupo omv IAL 2443, as quantidades de OMV são (da esquerda para direita) 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg, 0,625 µg, 0,3125 µg/mL.

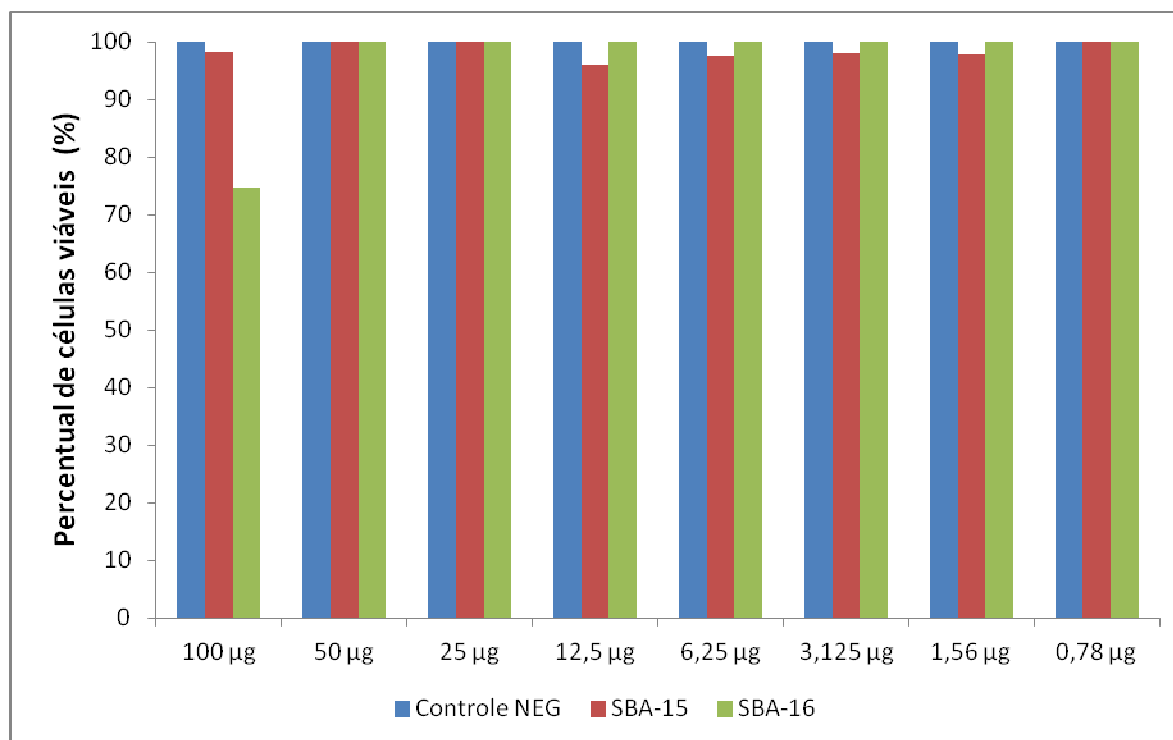


Figura 22. Teste de citotoxicidade celular das nanopartículas SBA-15 e SBA-16 em diferentes concentrações frente à célula VERO utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

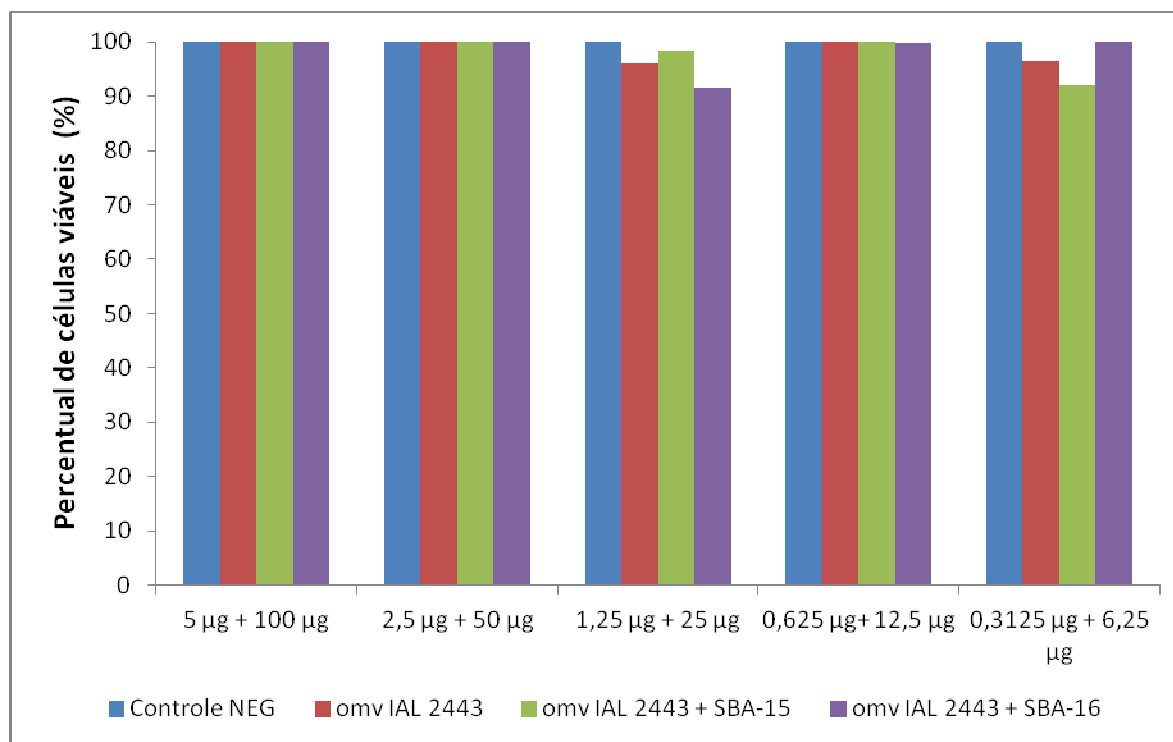


Figura 23. Teste de citotoxicidade celular da OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 (omv IAL 2443) isolada e OMV de *N. meningitidis* IAL 2443 associadas com a nanopartículas SBA-15 (omv IAL 2443 + SBA-15) e SBA-16 (omv IAL 2443 + SBA-16) em diferentes concentrações frente a célula VERO utilizando a técnica de Vermelho-Neutro para verificação da viabilidade celular. Valores expressos em percentual de células viáveis comparada com o controle negativo (Controle NEG).

*Para o grupo omv IAL 2443, as quantidades de OMV são (da esquerda para direita) 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg, 0,625 µg 0,3125 µg/mL.

Em linhas gerais, a utilização das nanopartículas de sílica SBA- 15 e SBA- 16 como adjuvantes vacinais em vacinas meningocócicas são um fato inédito na literatura científica vacinal. O aumento das taxas de resposta imunológica e uma maior cobertura da vacina dirigida contra uma cepa vacinal do sorogrupo B, frente a outras cepas pertencentes a diferentes sorogrupos de *N. meningitidis*. Tal propriedade pode ser devida a uma melhor apresentação dos epítomos vacinais devido a ativação das células apresentadoras de antígenos pela sílica mesoporosa.

Além disso, novas nanoestruturas como nanotubos de carbono, grafenos e fulerenos poderão ser no futuro alvo de pesquisas deste grupo, assim como, novos antígenos vacinais poliepitópicos, complexos como as OMVs ou ainda na forma de proteínas isoladas são alvos de recentes estudos na junção de tecnologia vacinal e Nanotecnologia.

CONCLUSÃO

5. Conclusões

- A utilização do processo fermentativo em estado semi-sólido é capaz de extrair da mesma qualidade e quantidade as vesículas de membrana externa;

- Diferentes linhagens de *N. meningitidis* possuem cinéticas de produção de OMV's distintas em tempo e quantidade;

- O efeito de mutações com a perda da expressão de *pile* afetam a cinética da produção de OMV's;

- O uso de adjuvantes de sílica mesoporosa SBA- 15 e SBA- 16 é eficiente com aumento do reconhecimento por anticorpos presentes no soro de animais vacinados com esses adjuvantes, em comparação com aqueles vacinados unicamente com as OMV's da cepa IAL2443;

- O teste de citotoxicidade em células VERO e 3T3 demonstrou inocuidade nas preparações adjuvadas com SBA- 15 e SBA- 16, atestando a segurança no uso destas preparações como adjuvantes vacinais;

- O uso dos adjuvantes SBA- 15 e SBA- 16 promovem o aumento do reconhecimento por anticorpos presentes no soro de animais vacinados a cepas de meningococo diferentes das cepas vacinais utilizadas para a vacinação aumentando a cobertura vacinal da OMV mediante a adição desses adjuvantes.

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

ALONSO, J.M., BERTHERAT, E., PEREA, W., BORROW, R., CHANTEAU, S., COHET, C., *et al.* [From genomics to surveillance, prevention and control: new challenges for the African meningitis belt]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2006 Dec;99(5):404-8.

ANTIGNAC, A. 2003. “Analyse des souches de *Neisseria meningitidis* de sensibilité diminuée à la pénicilline G”. Thèse Doctorale. Paris : Université Paris VII – Denis Diderot, UFR de Biochemie.

ASPHOLM, M., AAS, F. E., HARRISON, O. B., *et al.* 2010. Structural Alterations in a Component of Cytochrome c Oxidase and Molecular Evolution of Pathogenic *Neisseria* in Humans. *Plos Pathogens* 6 (8).

BARATA, R.C.B. Epidemia de doença meningocócica, 1970/1977. Aparecimento e disseminação do processo epidêmico. *Revista de Saúde Pública*, v. 22, p.16-24, 1988.

BIRBOIM, H.C. & DOLY, J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids. *Nucl Acid Res* 7: 1513-1523, 1979.

BORENFREUND, E. & PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985 Feb-Mar; 24 (2-3):119-24.

BORROW, R.; AABERGE, I.S.; SANTOS, G.F.; EUDEY, T.L.; OSTER, P.; GLENNIE, A.; FINDLOW, J.; HØIBY, E.A.; ROSENQVIST, E.; BALMER, P.; MARTIN, D. Interlaboratory standardization of the measurement of serum bactericidal activity by using human complement against meningococcal serogroup B, strain 44/76-SL, before and after vaccination with the Norwegian Menbvac outer membrane vesicle vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.12, n. 8, p. 970-976, 2005.

BOSLEGO, J.; GARCIA, J.; CRUZ, C.; ZOLLINGER, W.; BRANDT, B.; RUIZ, S.; MARTINEZ, M.; ARTHUR, J.; UNDERWOOD, P.; SILVA, W.; MORAN, E.; HANKINS, W.; GILLY, J. MAYS, J. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:p1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. *Vaccine*, v. 13, n. 9, p. 821-829,1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BREHONY, C., JOLLEY, K. A., MAIDEN, M. C. J. 2007. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 31: 15-26.

BRENNAN FR, DOUGAN G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine*. 2005;23:3210-22.

CALLAGHAN, M. J.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. 2006. Opacity-Associated Adhesin Repertoire in Hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 74: 5085-5094.

CARTWRIGHT, K. A. V. 1995. Meningococcal carriage and disease. In *Meningococcal disease*. Cartwright, K. (ed). Chichester: John Wiley and sons. 115-146.

CARTWRIGHT, K. A. V., STUART, J. M., JONES, D. M. et al. 1987. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidem Inf* 99: 591-601.

CARVALHO, L.V.; RUIZ, R.C.; SCARAMUZZI, K.; MARENGO, E.B.; MATOS, J.R.; TAMBOURGI, D.V.; FANTINI, M.C.A.; SANT'ANNA, O. A. Immunological parametres related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15.Vaccine. 2010 Nov 23;28(50):7829-36.

CAUGANT, D.A.; FROHOLM, L.O.; BOVRE, K.; HOLTRN, E., FRASCH, C.E.; MOCCA,L.F.; OLLINGER, W.D.; SELANER, R.K. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of Neisseria meningitidis causing epidemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 83, p. 4927-4931, 1986.

CLAASSEN, I.; MEYLIS, J.; VAN DER LEY, P.; PEETERS, C.; BRONS, H.; ROBERT, J.; BORSBOOM, D.; VAN DER ARK, A.; VAN STRAATERN, 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, v. 14, n. 10,p. 1001-1008, 1996.

COMANDUCCI, M.; BAMBINI, S.; BRUNELLI, B.; ADU-BOBIE, J.; ARICÓ, B.; CAPECCHI, B.; GIULIANI, M.M.; MASIGNANI, V.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; GRANOFF, D.M.; CAUGANT, D.A.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; MORA, M. NadA, a novel vaccine candidate of Neisseria meningitidis. The Journal of Experimental Medicine, v. 195, n. 11, p. 1445-1454, 2002.

COX JC, COULTER AR. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. Vaccine.1997;15(3):248-56.

DE JONGE, M. I.; VIDARSSON, G.; VAN DIJKEN, H. H.; et al. 2003. Functional Activity of Antibodies against the Recombinant OpaJ Protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 71: 2331-2340.

DE VOE, I. W.; GILCHRIST, J.E. Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 138, p.1156-1167, 1973.

DE VRIES, F. P., VAN DER ENDE, A., VAN PUTTEN, J. P. M., et al. 1996. Invasion of Primary Nasopharyngeal Epithelial Cells by *Neisseria meningitidis* Is Controlled by Phase Variation of Multiple Surface Antigens. *Infect. Immun.* 64: 2998-3006.

DEGHMANE, A.E., GIORGINI, D., LARRIBE, M., et al. 2002. Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol Microbiol.* 43: 1555–1564.

DEVOE, I. W. 1982. The Meningococcus and Mechanisms of Pathogenicity. *Microbiol Reviews* 46: 162-190.

DOLLAN-LIVENGOOD, J.M., MILLER, Y.K., MARTIN, et al. 2003. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 187: 1616-1628.

DUBNAU, D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 217-244.

DUNN, K. L., JAYNE, R., FARRANT, L., et al. 2003. Bacterial [Cu,Zn]-Cofactored Superoxide Dismutase Protects Opsonized, Encapsulated *Neisseria meningitidis*

FRASCH, C.E. Meningococcal Vaccines: past, present and future. In: Meningococcal Disease. Chichester, UK: Wiley, p. 246-283, 1995.

FRASCH, C.E.; VAN ALPHEN, L.; HOLST, J.; POOLMAN, J.T.; ROSENQVIST, E. Outer membrane protein vesicle vaccines for meningococcal disease. In: POLLARD, A.J.; MAIDEN, M.C.J. Methods in Molecular Medicine. Totowa: Humana Press, v. 66, p. 81-107, 2001.

FREDRIKSEN, J.H.; ROSENQVIST, E.; WEDEGE, E.; BRYN, K.; BJUNE, G.; FROHOLM, L.O.; LINDBAK, A.K.; MOGSTER, B.; NAMORK, E.; RYE, U.; STABBETORP, G.; WINSES, R.; AASE, B.; CLOSS, O. Production, characterization and control of MenB-Vaccine "Folkehelse": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. NIHP Ann., v. 14, p. 67-80, 1991.

from Phagocytosis by Human Monocytes/Macrophages. Infect. Immun. 71: 1604-1607.

GOMES, S.L.; SILVA, M.B.; RIBAS, J.C.; RUGAI, E.; AMOROSINO, A.; CAVE, J.J.D. Meningite cerebrospinal e sulfamidação maciça, preventiva. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 10, p. 77-85, 1950.

HILL, D. J., GRIFFITHS, N. J., BORODINA, E., et al. 2010. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. Clinical Science 118: 547-564.

HITCHCOCK, P. 1989. Unified Nomenclature for Pathogenic *Neisseria* Species. Clinical Microbiology Reviews. 2, Suppl. : S64-S65.

HOLLANDA, L. M. ; CURY, G. C.G. ; PEREIRA, R. F.C. ; FERREIRA, G. ; SOUSA, A. ; SOUSA, E.M.B. ; LANCELLOTTI, M. Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation.. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 9, p. 28, 2011.

IVERSSON, L.B. Aspectos epidemiológicos da meningite meningocócica no município de São Paulo (Brasil) no período de 1968 a 1974. *Revista de Saúde Pública*, v. 10: p. 1-16,1976.

JENNINGS, M.P., SRIKHANTA, Y.N., MOXON, E.R. et al. 1999. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol.* 145: 3013-3021.

JÓDAR, L.; FEAVERS, I.M.; SALLSBURRY, D.; GRANOFF, D.M. DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST MENINGOCOCCAL DISEASE. *Lancet*, v. 357, n. 9316, p. 4199-1508, 2002.

JOHNSTON, K.H.; GOTSCHLICH, E.C. Isolation and characterization of the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, v. 119, n. 1, p. 250-257, 1974.

KNAPP, J. S., CLARK, V. L. 1984. Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. *Infect Immun* 46: 176-181.

KORNELISSE, R. F., HACK, C. E., SAVELKOU, H. F. J. 1997. Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis. *Infect. Immun.* 65: 877-881.

L. ZHAO; S.S. FENG. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembranes, *Journal of colloid and interface science* 274 (2004) 55-68

LANCELOTTI, M. 2005. 'Rôle de la capsule dans la virulence de *Neisseria meningitidis*'. Thèse Doctorale.. Paris : Université Paris VII – Denis Diderot, UFR de Biologie Moléculaire et Cellulaire.

LANCELOTTI, M., GUIYOULE, A., RUCKLY, C., ET AL. 2006. Capsule switching C to B in clinical isolates of *Neisseria meningitidis* of the clonal complex ET-37/ST-11 with conserved virulence. *Microb. Infect.* 8: 191-196.

LIMA, MGS. Uso de óleos vegetais como adjuvantes da resposta imunológica em procedimentos de imunização/vacinação. Departamento de bioquímica e biologia molecular. Disponível em:
<http://64.233.169.104/search?q=cache:jqM2aWE1K04J:sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Palestras/028.pdf+sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/palestras/028.pdf&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br> [2008 jan 08].

lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through toll-like receptor 2. *Infection and Immunity* 69: 2230-2236.

MAIDEN, M. C. J., CAUGANT, D. A. 2006. The Population Biology of *Neisseria meningitidis*: Implications for Meningococcal Disease, *Epidemiology and Control*. In: Frosch, M., Maiden M., eds. *Handbook of Meningococcal Disease*. Weinheim: Wiley-VGH-Verlag:17-28.

MAIREY, E., GENOVESIO, A., DONNADIEU, E., et al. 2006. Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp. Med.* 203: 1939-1950.

MASSARI, P., HO, Y., WETZLER, L. M. 2000. *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9070-9075.

MATTOS, I. B.; ALVES, D. A.; HOLLANDA, L. M.; CERAGIOGLI, H. J.; BARANAUSKAS, V.; LANCELLOTTI, M. Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 9, p. 53, 2011.

MILAGRES, L.G.; GORLA, M.C.O; SACCHI, C.T.; RODRIGUES, M.M. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 10, p. 4755-4761, 1998.

MILAGRES, L.G.; RAMOS, S.R.; SACCHI, C.T., MELLES, C.E.A.; VIEIRA, V.S.D.; SATO, H.; BRITO, 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. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 10, p. 4419-4424, 1994.

MORAES, J.C.; PERKINS, B.A.; CAMARGO, M.C.C.; HIDALGO, N.T.R.; BARBOSA, H.A.; SACCHI, C.T.; GRAL, I.M.L.; GATTAS, V.L.; VASCONCELOS, H.G.; PLIKAYTIS, B.D.; WENGER, J. D.; BROOME, C.V. Protective efficacy of a

serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo, Brazil. *Lancet*, v. 340, p. 1074-1078, 1992.

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

NORONHA, C.P.; STRUCHINER, C.J.; HALLORAN, M.E. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. *International Journal Epidemiology*, v. 24, p. 1050-1057, 1995.

PASHINE A, VALIANTE NM, ULMER JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nature Medicine*. 2005;11(4):S63-68.

PECAUT, M. J.; SMITH, A. L.; JONES, T. A.; GRIDLEY, D. S. Modification of immunologic and hematologic variables by method of CO₂ euthanasia. *Comparative Medicine*, v. 50, n. 6, p. 595-602, 2000.

POOLMAN, J.T. Development of a meningococcal vaccine. *Infectious Agents and Disease*, v. 4, p. 13-28, 1995.

POOLMAN, J.T. Polysaccharides and membrane vaccines. In: NIZRAHI, A. *Bacterial vaccines*. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

PRON, B., TAHA, M.-K., RAMBAUD, C., et al. 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the Components of the Blood-Brain Barrier Correlates with an Increased Expression of PilC. *J Infect Dis*. 176: 1285-1292.

RAMON, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. Bulletin de la Société Central de Médecine Veterinaire, v. 101, p. 227-234, 1925.

RAMON, G. Procédés pour accroître la production des antitoxines. Annales de l'Institut Pasteur, v.40, p. 1-10, 1926.

ROBINSON, K., NEAL, K. R., HOWARD, C. 2002. Characterization of Humoral and Cellular Immune Responses Elited by Meningococcal Carriage. Infect. Immun. 70 (3): 1301-1309.

ROJAS-CHAPANA, J.; TROSZCZYNSKA, J.; FIRKOWSKA, I.; MORSCZECK, C.; GIERSIG, M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. Lab Chip. 2005 May;5(5):536-9.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, AND T. MANIATIS. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

SCHEUERPFUG, I., RUDEL, T., RYLL, R., et al. 1999. Roles of PilC and PilE Proteins in Pilus-Mediated Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to Human Erythrocytes and Endothelial and Epithelial Cells. Infect. Immun. 67: 834-843.

SCHINJS, V.E.J.C. Immunological Concepts of Vaccine Adjuvant Activity. Current Opinion in Immunology, v. 12, p. 456-463, 2000.

SCHNEIDER, H., HALE, T.L., ZOLLINGER, W.D. et al. 1984. Heterogeneity of molecular size and antigenic expression within lipooligosaccharides of individual strains of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 45: 544-549.

SCHUBERT-UNKMEIR, A., KONRAD, C., SLANINA, H., et al. 2010. *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathogen* 6: e1000874.

SOUZA, K.C.; ARDISSON, J.D.; SOUSA, E.M. Study of mesoporous silica/magnetite systems in drug controlled release. *J Mater Sci Mater Med* 2009, 20:507-512.

STEPHENS, D., GREENWOOD, B., BRANDTZAEG, P. 2007. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369: 2196-2206.

SULAHIAN, A., M. TABOURET, P. RIBAUD, J. SARFATI, E. GLUCKMAN, J. P. LATGE, AND F. DEROUIN. 1996. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:139–145.

SWARTLEY, J.S., MARFIN, A.A., EDUPUGANTI, S., et al. 1997. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 271-276.

TAHA MK, MORAND PC, PEREIRA Y et al. Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol* 1998; 28 (6):1153-63.

TAHA, M.-K., DEGHMANE, A.-E., ANTIGNAC, A. et al. 2002. The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. *TRENDS in Microbiol.* 1: 376-382.

TSOLAKOS, N.; LIE, K.; BOLSTAD, K.; MASLEN, S. et al. Characterization of meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines from strain 44/76 after growth in different media. *Vaccine* 28 (2010) 3211–3218.

TONJUM, T., KOOMEYB, M. 1997. The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships – a review. *Gene* 192: 155-163.

ULI L, CASTELLANOS-SERRA L, BETANCOURT L, DOMINGUEZ F, BARBERA R, SOTOLONGO F, GUILLEN G, PAJON FEYT R. Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2006 Jun;6(11):3389-99

URWIN, R., RUSSEL, J. E., THOMPSON, E. A. L., et al. 2004. Distribution of Surface Protein Variants among Hyperinvasive Meningococci: Implications for Vaccine Design. *Infect. Immun.* 72: 5955-5962.

VAN DER LEY, P., HECKELS, J. E., VIRJI, M., et al. 1991. Topology of Outer Membrane Porins in Pathogenic *Neisseria* spp. *Infect. Immun.* 5: 2963-2971.

VAN DER WOUDE, M. W., BÄUMLER, A. J. 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiol. Reviews* 17: 581-611.

VAN DEUREN, M., BRANDTZAEG, P., VAN DER MEER, J. M. 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 13 (1): 144-166.

YERO D, PAJON R, CABALLERO E, GONZALEZ S, COBAS K, FARINAS M, LOPEZ Y, ACOSTA A. A novel method to screen genomic libraries that combines genomic immunization with the prime-boost strategy. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007 Aug;50(3):430-3.

ZARANTONELLI ML, ANTIGNAC A, LANCELLOTTI M, GUIYOULE A, ALONSO JM, TAHA MK. Immunogenicity of meningococcal PBP2 during natural infection and protective activity of anti-PBP2 antibodies against meningococcal bacteraemia in mice. *J Antimicrob Chemother.* 2006 May;57(5):924-30.

ZOLLINGER, W.D. New and improved vaccines against meningococcal disease. In: WOODROW, G.L.; KAPER, J.B.; COBON, G.S. *New generation of vaccines.* New York: Marcel Dekker, 1997. p. 469-488.

ZUGHAIER, S. M., TZENG, Y., ZIMMER, S. M., et al. 2004. *Neisseria meningitidis* Lipooligosaccharide Structure-Dependent Activation of the Macrophage CD14/Toll-Like Receptor 4 Pathway. *Am. Society for Microbiol.* 72 : 371-380.

ANEXOS

7. Anexos

ANEXO I



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

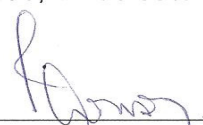
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "**Efeito de partículas mesoporosas no uso de vesículas de membrana externa de Neisseria meningitidis**" (protocolo nº **2529-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Lancellotti / Danilo Antonini Alves**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **12 de setembro de 2011**.

Campinas, 12 de setembro de 2011.


 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

ANEXO II

Análise estatística utilizando a metodologia de *Tukey's Test One Way* da comparação dos soros dos camundongos imunizados com OMV da cepa de *Neisseria meningitidis* IAL 2443 com as associações de OMV *Neisseria meningitidis* IAL 2443 com SBA-15 e OMV *Neisseria meningitidis* IAL 2443 com SBA-16, frente ao *coating* bacteriano das cepas de *N. meningitidis* utilizadas no trabalho.

Coating bacteriano: IAL 2443

Titulação	SBA-15	SBA-16
1:500	P= 0,2310, Não Significativo	P= 0,3186, Não Significativo
1:1.000	P= 0,2063, Não Significativo	P= 0,2524, Não Significativo
1:2.000	P= 0,1494, Não Significativo	P= 0,5487, Não Significativo
1:4.000	P= 0,0028, Muito Significativo	P= 0,3148, Não Significativo
1:8.000	P= 0,0018, Muito Significativo	P= 0,1698, Não Significativo
1:16.000	P= 0,0005, Extremamente Significativo	P= 0,3667, Não Significativo
1:32.000	P= 0,0003, Extremamente Significativo	P= 0,2221, Não Significativo

Coating bacteriano: B4

Titulação	SBA-15	SBA-16
1:500	P= 0,0006, Extremamente Significativo	P= 0,0005, Extremamente Significativo
1:1.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,0003, Extremamente Significativo
1:2.000	P= 0,0002, Extremamente Significativo	P= 0,0084, Muito Significativo
1:4.000	P= 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,0027, Muito Significativo
1:8.000	P= 0,0004, Extremamente Significativo	P= 0,0069, Muito Significativo
1:16.000	P= 0,1829, Não Significativo	P= 0,2112, Não Significativo
1:32.000	P= 0,0411, Significativo	P= 0,1691, Não Significativo

Coating bacteriano: P2354

Titulação	SBA-15	SBA-16
1:500	P= 0,0040, Muito Significativo	P= 0,0043, Muito Significativo
1:1.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,0009, Extremamente Significativo
1:2.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= < 0,0001, Extremamente Significativo
1:4.000	P= 0,0004, Extremamente Significativo	P= 0,0008, Extremamente Significativo
1:8.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= < 0,0001, Extremamente Significativo
1:16.000	P= 0,0003, Extremamente Significativo	P= 0,0064, Muito Significativo
1:32.000	P= 0,0004, Extremamente Significativo	P= 0,0005, Extremamente Significativo

Coating bacteriano: C2135

Titulação	SBA-15	SBA-16
1:500	P= 0,0464, Significativo	P= 0,0186, Significativo
1:1.000	P= 0,0008, Extremamente Significativo	P= < 0,0001, Extremamente Significativo
1:2.000	P= 0,0579, Não Significativo	P= 0,0129, Significativo
1:4.000	P= 0,0062, Muito Significativo	P= < 0,0001, Extremamente Significativo
1:8.000	P= 0,0071, Muito Significativo	P= 0,0033, Muito Significativo
1:16.000	P= 0,0151, Significativo	P= < 0,0001, Extremamente Significativo
1:32.000	P= 0,2335, Não Significativo	P= 0,0635, Não Significativo

Coating bacteriano: P2143

Titulação	SBA-15	SBA-16
1:500	P= 0,0060, Muito Significativo	P= < 0,0001, Extremamente Significativo
1:1.000	P= 0,0004, Extremamente Significativo	P= 0,0002, Extremamente Significativo
1:2.000	P= 0,0013, Muito Significativo	P= 0,0004, Extremamente Significativo
1:4.000	P= 0,0003, Extremamente Significativo	P= 0,0063, Muito Significativo
1:8.000	P= 0,0046, Muito Significativo	P= 0,0129, Significativo
1:16.000	P= 0,0449, Significativo	P= 0,0167, Significativo
1:32.000	P= 0,0108, Significativo	P= 0,0205, Significativo

Coating bacteriano: Y USA

Titulação	SBA-15	SBA-16
1:500	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,0851, Não Significativo
1:1.000	P= 0,0002, Extremamente Significativo	P= 0,0831, Não Significativo
1:2.000	P= 0,0159, Significativo	P= 0,1733, Não Significativo
1:4.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,1084, Não Significativo
1:8.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,0011, Muito Significativo
1:16.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,0007, Muito Significativo
1:32.000	P= < 0,0001, Extremamente Significativo	P= 0,5000, Não Significativo