

Mario Sérvulo Izidoro Junior

**“Caracterização e análise de vesículas de membrana externa de
Neisseria meningitidis em cultura celular de glioblastoma NG97”**

CAMPINAS

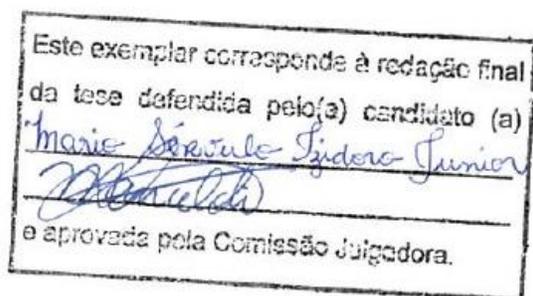
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIO SÉRVULO IZIDORO JUNIOR

**“Caracterização e análise de vesículas de membrana externa de
Neisseria meningitidis em cultura celular de glioblastoma NG97”**



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,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Iz3c Izidoro Junior, Mario Sérvulo, 1986-
Caracterização e análise de vesículas de membrana
externa de *Neisseria meningitidis* em cultura de células de
Glioblastoma NG97 / Mario Sérvulo Izidoro Junior. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Lancellotti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Vesícula de membrana
externa. 3. Glioblastoma. 4. NG97. I. Lancellotti,
Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization and analysis of OMVs produced by *Neisseria meningitidis* against tumor Glioblastoma cell line NG97

Palavras-chave em Inglês:

Neisseria meningitidis

Outer membrane vesicle

Glioblastoma

NG97

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Lancellotti [Orientador]

Marcus Alexandre Finzi Corat

Daniel Maragno Trindade

Data da defesa: 01-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 1 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (Orientador)



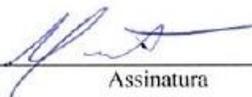
Assinatura

Dr. Daniel Maragno Trindade



Assinatura

Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat



Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araujo

Assinatura

Dra. Cíntia Maria Saia Cereda

Assinatura

“(...) the caution blocks you from the wind. Hold it up.”

Alanis Morissette

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio, suporte e principalmente todo carinho ao longo desses anos. Nunca tive a oportunidade de agradecê-los por lutarem contra o que acreditavam por mim, pela minha felicidade. Amo todos vocês: Pai, quero ter sua calma pra resolver tudo e obrigado por me dar a chance de ter nascido no mesmo dia que você, só eu sei como eu gosto disso; Mãe, quero amar as pessoas como você ama e conseguir colocar os outros em primeiro como você nunca deixou de fazer; Fá, meu leãozinho, minha risada incontrolável; Adri, por que eu sei que nada vai acontecer comigo enquanto você estiver por perto?; Melissóx, me empresta essa paz que só você tem?; Lili, a pessoa que eu posso falar absolutamente tudo sem ter medo de ser feliz. Tio Marcos, Tia Marina, Lu e Lau por não deixarem nunca o significado de família sair da minha mente. Vó, agradeço por se esforçar tanto em fazer eu me sentir especial desde o momento em que nasci e nunca ter tirado o posto de "reizinho" de mim; Vô Daniel, por não ter nenhum laço sanguíneo e me amar mais que qualquer coisa na sua vida. Ao meu Vô Nicolau, faço tanta força em te contrariar mas acho que, de certa forma, você me fez virar um cientista me perguntando quase todo dia por que as árvores vivem tanto e os homens não; Agradeço aos meus sobrinhos Kaka e Nini que renovam minhas forças toda vez que os abraço.

Ao meu amor que anda de mão dada comigo no caminho errado e não me deixa ver nada de ruim que acontece. Nunca. E me deixar saber que um colchão no chão é mais que suficiente pra me fazer feliz.

Ao meu orientador e amigo Marcelo Lancellotti, por toda experiência dividida, sabedoria e companheirismo durante esses anos.

À banca examinadora por aceitarem meu convite e serem tão pungentes no esforço de fazer este trabalho melhor em todos os sentidos. Obrigado.

Aos meu colegas de trabalho, na verdade aos meus irmãos de trabalho. As pessoas que fazem meus dias mais engraçados, interessantes e que, na hora do aperto, vão pro laboratório de madrugada tirar experimento. Rafaella, Danilo, Ana, Xúlia, Sexy, Lu, Thaís, Carol, Natali e Washington.

Aos meus amigos, de verdade. Lidia, Bebel, Simone, Rapha, Luiz, Nikole e Gilmar (desculpem por já ter colocado pesos incríveis nas costas de vocês e terem sempre me erguido com um sorriso no rosto), Vonei, Peste, Cadu, Jean, Jair, Polete, Hugo, Gian,

Thomas, Ste e Rafa Bas (meu castelo), Carlitcha. Aos meus amigos de Santo André pelos anos de amizade: Flávia, Maria, Ana Dani, Peque, Bru, Elis, Lívia, Ghre e Gi.

À Professora Dra. Daniele Ribeiro de Araújo pelas análises feitas em suas instalações e toda disponibilidade, sempre.

À UNICAMP por todo incentivo e espaço, à CAPES, CNPq e FAPESP pela ajuda financeira.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	4
LISTA DE ABREVIações	6
INTRODUÇÃO.....	7
<i>Neisseria meningitidis</i>	7
Bactérias no tratamento tumoral.....	10
Vesículas de membrana externa (OMVs)	12
Modelo Experimental Neuronal - Células NG97	18
OBJETIVOS	19
METODOLOGIA.....	20
Meios de Cultivo Bacteriano	20
Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar.....	20
Ágar Chocolate	20
Meio GC.....	20
Suplemento	21
Meio Luria Bertani (LA e LB).....	21
Meios de Cultivo Celular para a linhagem celular NG97	21
Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento	22
Construção dos mutantes <i>Neisseria meningitidis</i>	23
Extração de DNA genômico.....	23
Reação em cadeia da polimerase (PCR).	24
Clonagem em pGem®-T Easy (Promega) do fragmentos amplificado por PCR para inativação gênica	27
Transformação em Células Competentes de <i>Escherichia coli</i>	27
Preparo de Células competentes de DH5- α	27
Processo de Transformação em <i>Escherichia coli</i> linhagem DH5- α	28
Extração de DNA Plasmidial em Média Escala	29
Soluções.....	29
Metodologia de extração plasmidial em média escala	30
Inserção do gene de resistência a Eritromicina.....	31

Processo de Transformação do plasmídeo contendo dois genes de resistência em <i>Escherichia coli</i> linhagem DH5- α	32
Processo de "knock-out" utilizando pGem [®] -T Easy (Promega) em <i>Neisseria meningitidis</i> linhagem C2135	33
Método de extração da vesícula de membrana externa (OMV)	34
Caracterização das OMVs	35
Cultivo Celular da linhagem NG97.....	36
Teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho- Neutro	37
Análise morfológica de culturas celulares após infecção com OMVs de <i>N. meningitidis</i>	37
Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias por PCR em Tempo Real	38
Extração de RNA	38
PCR em tempo real quantitativo (qRT – PCR).....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
Construção das cepas "knock-outs"	42
C2135 Δ synA.....	42
C2135 Δ pilE	44
Caracterização das OMVs	45
Microscopia eletrônica de transmissão.....	45
Espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética.....	46
Teste de Bradford	53
Teste morfológico	55
Citotoxicidade em células NG97 pela incorporação do vermelho neutro.....	57
Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias por PCR em tempo real	58
CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

Embora comensal da nasofaringe humana, algumas linhagens de *Neisseria meningitidis* ocasionalmente ultrapassam a mucosa respiratória e a barreira hematoencefálica causando doenças como meningite e septicemia. Sabe-se também que bactérias em geral possuem taxa por células cancerígenas, isto é, possuem uma predileção por infectar células tumorais. Desta forma, neste trabalho produzimos OMV de diversas linhagens de *Neisseria meningitidis* e analisamos as principais características físico-químicas destas vesículas e, além disso, também verificamos as principais interações desta micropartícula com a linhagem celular NG97, uma linhagem de glioblastoma, tecido pelo qual tal bactéria é conhecida por infectar em casos patológicos, por testes morfológicos *in vitro* e também analisamos as citocinas inflamatórias através de quantificação relativa por Real time PCR. O grande achado deste trabalho é que a utilização de ultrafiltração substituindo a ultracentrifugação na produção de OMVs é viável, menos trabalhosa e mais rápida que os métodos descritos na literatura. Além disso, as vesículas extraídas por tal processo apresentam tamanhos e cargas superficiais como os encontrados na literatura sendo que cada cepa produz diferentes quantidades de OMVs para um mesmo tempo. Ainda, observou-se que as OMVs obtidas de linhagens atenuadas para os fatores de virulência causaram menores alterações morfológicas na linhagem NG97 do que as OMVs obtidas a partir de linhagens selvagens. A influência de tais fatores de virulência, que auxiliam na interação das células do parasita com as células do hospedeiro, também foram observadas na análise das citocinas inflamatórias produzidas, onde foram constatados que na ausência da pilina (proteína responsável pela aderência da bactéria com células epiteliais e endoteliais) a produção de citocinas foi praticamente nula quando comparada com suas diferentes linhagens onde este fator de virulência é presente. Para um possível uso destas vesículas como sistemas lipossomais

de entrega de drogas, acredita-se que quanto mais inócua a vesícula for maior seria a biodisponibilidade da molécula antitumoral a ser entregue, como é o caso da OMV produzida pela cepa C2135 Δ pilE que além disso, possui um tamanho menor de 200nm sendo capaz de penetrar nas junções celulares da massa tumoral.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis is a human nasopharyngeal commensal, however, some strains occasionally exceed the respiratory mucosa and the blood brain barrier causing diseases such as meningitis and septicemia. It is well established that bacteria has a natural predilection to infect cancer cells. Thus, this study produced OMVs from different strains of *Neisseria meningitidis* and analyzed physicochemical characteristics of these vesicles such as size and surface charge, and also, the main interactions between this nanoparticle and NG97 cell line by in vitro morphological tests and the analyze of the production of inflammatory cytokines by relative quantification Real time PCR. The major finding of this study is that the use of ultrafiltration substituting ultracentrifugation on OMVs production makes the extraction viable, less laborous and faster than previous methods. Furthermore, the vesicles extracted by this process exhibited similar sizes and surface charges when compared to the literature and each strain produces different amounts of OMVs when comparing the same production time. In this work, we also observed that the OMVs generated by attenuated strains for virulence factors induced less morphological changes in the NG97 cells than OMVs generated from wild type strains. This trend where virulence factors which assist the parasite-host cells interaction was also observed in the analysis of cytokines produced. It was observed in the absence of pilin (protein responsible for adherence of the bacteria to epithelial and endothelial cells) the production of cytokines was much lower when compared with the different strains where this virulence factor is present. For a possible use of these liposomal vesicles as delivery systems for drugs, it is believed that the more innocuous the greater the bioavailability of the antitumor molecule to be delivered, as in the case of OMV produced by the strain C2135 Δ pilE, moreover, having a size around 200 nm fits perfectly between the cell junctions allowing the nanoparticle to reach the tumor mass, but further studies are required to confirm this hypothesis.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação do sorogrupo e da sua respectiva cápsula polissacarídica.

Figura 2: Localização do cinturão africano da meningite retirado do site da organização mundial de saúde.

Figura 3: esquema da membrana externa de uma bactéria gram negativa.

Figura 4: Esquema da biogênese de OMVs.

Figura 5: esquema da produção e extração de vesículas de membrana externa de bactérias gram-negativas.

Figura 6: Esquema da produção da linhagem C2135 $\Delta synA$.

Figura 7: Gel de agarose com a amplificação do cassete de resistência *ermAM* da linhagem mutada.

Figura 8: Esquema da produção da linhagem C2135 $\Delta pilE$.

Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão das vesículas de membrana externa analisadas neste trabalho provenientes de 6 diferentes linhagens de *N. meningitidis*.

Figura 10: Distribuição das OMVs extraídas da cepa C2135 por picos e tamanhos.

Figura 11: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa C2135.

Figura 12: Distribuição das OMVs extraídas da cepa C2135 $\Delta pilE$ por picos e tamanhos.

Figura 13: Pontencial zeta em (mV) da OMV da cepa C2135 $\Delta pilE$.

Figura 14: Distribuição das OMVs extraídas da cepa C2135 $\Delta synA$ por picos e tamanhos.

Figura 15: Pontencial zeta em (mV) da OMV da cepa C2135 $\Delta synA$.

Figura 16: Distribuição das OMVs extraídas da cepa B4 por picos e tamanhos.

Figura 17: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa B4.

Figura 18: Distribuição das OMVs extraídas da cepa P374 por picos e tamanhos.

Figura 19: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa P374.

Figura 20: Distribuição das OMVs extraídas da cepa P2143 por picos e tamanhos.

Figura 21: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa P2143

Figura 22: Curva construída com as concentrações e absorbâncias obtidas a partir da solução padrão. Aplicando-se o método dos mínimos quadrados aos dados, obtém-se a reta descrita pela equação 1. $C=390,47 \times A-56,041$.

Figura 23: Porcentagem de células com alteração morfológica.

Figura 24: Alterações encontradas no teste morfológico no presente trabalho.

Figura 25: porcentagem de células viáveis pós aplicação das OMVs em células NG97.

Figura 26: Diferença em expressão dos genes de interleucinas quando comparados ao controle endógeno GAPDH nas células NG97 pós-interação com OMVs de diferentes linhagens de meningococo.

Figura 27: Diferença em expressão dos genes de interleucinas quando comparados ao controle endógeno GAPDH nas células NG97 pós interação com OMVs linhagens mutadas de meningococo.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no trabalho.

Tabela 3: oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Tabela 4: Linhagem de origem de cada OMV com seu respectivo tamanho médio (nm) e potencial zeta (mV).

Tabela 5: concentração de proteína para OMVs originadas de diferentes linhagens.

LISTA DE ABREVIÇÕES

- BSA: “*bovine serum albumin*”;
- CEMIB: Centro de Bioterismo;
- Cyt: citosol;
- ELISA: “*enzyme-linked immunosorbent assay*”;
- IAL: Instituto Adolfo Lutz;
- IM: membrana interna;
- LPS: lipopolissacarídeos;
- OM: membrana externa;
- OMV: “*outer membrane vesicles*”;
- PBS: “*phosphate-buffered saline*”;
- PG: camada de peptidoglicano;
- PS: espaço periplasmático;
- RPM: rotações por minuto;
- UFC: unidades formadoras de colônia.

INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis

N. meningitidis ou meningococo é um diplococo gram-negativo encapsulado, não esporulado e não flagelado pertencente à classe das β -proteobactérias e membro da família *Neisseriaceae*. A quantidade de bactérias que compreendem o gênero *Neisseria* é bastante elevada e os principais componentes patogênicos desse grupo são os microrganismos das espécies *meningitidis* e *gonorrhoeae*. Grande parte da população mundial possui a espécie *Neisseria meningitidis* colonizando de maneira comensal a mucosa do trato respiratório superior (Caugant *et al.*, 1994) sendo assim, esta pode colonizar o hospedeiro sem, no entanto, causar algum tipo de patologia. Este fenômeno é conhecido, do ponto de vista do hospedeiro, como estado de portador (Caugant *et al.*, 1994) além disso, por ser um patógeno-ocasional, em indivíduos receptivos, a colonização assintomática pode dar lugar à uma infecção invasiva (de Vries *et al.*, 1996, Taha *et al.*, 2002), que ocorre após um período de proliferação, culminando na entrada do microrganismo na circulação sistêmica através da própria mucosa (Brandtzaeg, 1995). Essa invasão gera a meningococemia e/ou meningite, causada pela entrada das bactérias nas meninges e que clinicamente desencadeia febre, vômitos, rigidez na nuca, dentre outros sintomas (DeVoe, 1982).

A classificação dos meningococos é determinada pelos seus diferentes tipos de cápsula. A capsula é um polissacarídeo que envolve a bactéria e que determina a subdivisão da espécie em sorogrupos (Baehr *et al.*, 1989, Hitchcock *et al.*, 1986, Hussey *et al.*, 1997, Wong *et al.*, 1989). Existem no total 13 sorogrupos, dentre estes, cinco sorogrupos (A, B, C, Y e W135) são frequentemente associados com casos de invasão do organismo ao hospedeiro (Harrison *et al.*, 2006, Bart *et al.*, 2001, Chanteau *et al.*, 2007, Bakir *et al.*, 2001). Abaixo segue uma figura com a composição polissacarídica dos cinco sorogrupos encontrados mais frequentemente nas infecções meningocócicas.

SOROGRUPO	CÁPSULA POLISSACARÍDICA
A	α - <i>N</i> -acetil <i>D</i> -manosamina - 1-fosfato
B	α -2,8, ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
C	α -2,9, ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
W135	D-galactose e ácido <i>N</i> -acetilneuramínico 1:1
Y	D-glicose e ácido <i>N</i> -acetilneuramínico 1:1

Figura 1: Representação do sorogrupo e da sua respectiva cápsula polissacarídica, adaptado de (Tzeng & Stephens, 2000).

Dados epidemiológicos e experimentais sugerem que o polissacarídeo capsular, o qual constitui o principal fator de virulência desta bactéria, e também um dos fatores de virulência mais bem definidos até o momento, são necessários, mas não são suficiente para conferir toda a virulência deste microrganismo (Nassif, 2000, Tzeng & Stephens, 2000, Schoen *et al.*). Mais recentemente outros sorogrupos surgiram com características epidemiológicas semelhantes aos grupos acima citados, como os sorogrupos 29E, X e Z (Bennett *et al.*, 2004, Etienne *et al.*, 1990, Safadi & Barros, 2006).

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 (Iversson, 1976). Em 1971 ocorreram duas novas epidemias na grande São Paulo, uma causada por *N. meningitidis* C e outra pela *N. meningitidis* A (Iversson, 1976). Apesar da importância desta bactéria do ponto de vista epidemiológico no Brasil, esta também apresentou diversos casos de epidemias espalhadas pelo globo,

sendo alvo de estudos para ajudar a conter possíveis novas disseminações no globo. Um bom exemplo de epidemias no globo esta presente no cinturão africano da meningite (Figura 2), onde ocorrem epidemias no período de seca (de novembro a junho) quase todo ano como.



Figura 2: Localização do cinturão africano da meningite retirado do site da organização mundial de saúde, em cinza aparecem os países que compreendem a África e em laranja a região afetada pela epidemia.

Um dos fatores que tornam esta bactéria intrigante e perigosa é o seu peculiar mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro conhecido por *switch* capsular onde a bactéria pode produzir um novo tipo de cápsula diferente do que produz normalmente de acordo com a hostilidade do ambiente onde esta inserida (Swartley *et al.*, 1997, Lancellotti *et al.*, 2006). O que torna tal processo possível é a facilidade com que ocorre a transferência de material genético entre as linhagens de *N. meningitidis* e a

capacidade de incorporar naturalmente um DNA exógeno (Lancellotti et al., 2006). Essa transferência, chamada de transmissão gênica horizontal, concede à bactéria receptora a capacidade de expressar, por exemplo, um novo tipo de cápsula (Mattos *et al.*, Swartley et al., 1997, Zarantonelli *et al.*, 2006, Hollanda *et al.*).

A *N. meningitidis* não apresenta apenas a capacidade de expressar genes obtidos de bactérias da sua mesma espécie, mas também apresentar características inerentes a outras espécies, como por exemplo, alguns polissacarídeos encontrados nesta espécie são semelhantes aos encontradas em *Haemophilus influenzae*, o que indica uma possível troca de material genético entre elas no curso da evolução (Achtman, 2004, Frosch *et al.*, 1991, Maiden *et al.*, 1998).

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

Bactérias no tratamento tumoral

As primeiras observações de que bactérias serviriam como prováveis agentes antitumorais foram realizadas há cerca de 300 anos. Entretanto, os trabalhos mais significativos datam de 1868 e 1882, quando os doutores W. Busch e F. Fehleisen observaram que certos tipos de câncer inoperáveis regrediram quando os pacientes eram infectados por *Streptococcus pyogenes* e desenvolviam erisipela (doença cutânea resultado da infecção bacteriana por *Streptococcus* do tipo A). Além disso, outro trabalho em 1890, realizado por William Coley demonstrou que uma mistura de linhagens mortas pelo aquecimento de *Streptococcus pyogenes* com *Serratia marcescens* foram eficazes no tratamento de pacientes com câncer. Esta combinação de bactérias ficou conhecida como toxina de Coley e foi utilizada no tratamento de sarcomas até o ano de 1963 (Wei *et al.*, 2009).

Em 1935, Connell utilizando filtrados esterilizados de *Clostridium histolyticum* observou que os tumores regrediam devido a enzimas proteolíticas produzidas por esta bactéria (Connell, 1935). Linhagens de *Clostridia sp* foram testadas em modelos animais e humanos, mas, sem o efeito terapêutico esperado. Desta maneira, a linha de pesquisa que utilizava bactérias no tratamento de tumores ficou estagnada o começo do século XXI, quando Morales, Eidinger e Bruce demonstraram que o bacilo de Calmette-Guerin (BCG) fora empregado com sucesso no tratamento de câncer superficial de bexiga (Morales et al., 2002) e atualmente, esta terapêutica é amplamente utilizada para o tratamento de pacientes com este tipo de tumor (Shintani *et al.*, 2007). Além destas bactérias anteriormente descritas, outras linhagens bacterianas como, por exemplo, *Bifidobacterium (longum, adolescentis e infantis)*, *Listeria monocytogenes* e outras atenuadas de *Clostridium (sporogenes, novyi, butyricum, acetobutylicum, oncolyticum, beijerinckii)* foram utilizadas com sucesso no tratamento de tumores sólidos (Wei *et al.*, 2008).

Em 2009, foi descoberto como induzir células bacterianas a se dividirem a partir de suas extremidades, ao invés de a partir do seu centro, produzindo o que eles chamaram de mini células ou EDVs (EnGeneIC Delivery Vehicles). Estas minicélulas bacterianas são baratas, fáceis de produzir e podem ser utilizadas como sistema de entrega de medicamento mais específico para células tumorais do que as drogas atualmente empregadas. Estas minicélulas são como bactérias mas não possuem cromossomos e não possuem capacidade de divisão, diz MacDiarmid. Por possuírem uma membrana rígida, elas não se rompem ao serem injetadas e carregam seu volume para os sítios alvo. Estas minicélulas também são capazes de atingirem seletivamente diferentes tecidos graças à anticorpos incorporados em sua superfície. Para isso um braço do anticorpo específico para a EDV é conectado via uma molécula ligante a um segundo anticorpo, que é específico para uma proteína do tecido alvo. Por exemplo, anticorpos anti

Her2 (receptores em células de câncer de mama que respondem a Herceptina) (Macdiarmid *et al.*, 2009).

Vesículas de membrana externa (OMVs)

Bactérias gram-negativas, assim como todas as outras células, interagem com o meio ambiente e estas interações são frequentemente realizadas por moléculas secretadas pela célula bacteriana. A secreção é um aspecto importante das bactérias gram-negativas, que oferece vantagens distintas sobre materiais diretamente associados à bactéria. Através da secreção a bactéria consegue interagir com o ambiente sem gastar energia para se mover. O material secretado além de não viável é de uma dimensão menor, portanto pode influenciar um ambiente inacessível para a bactéria inteira seja pelo seu tamanho ou restrições ao crescimento bacteriano presente naquele local. Os materiais secretados são tipicamente solúveis, no entanto, células pertencentes a todos os domínios da vida possuem mecanismos específicos para secretar material insolúvel (Kulp & Kuehn, 2008).

Para melhor entender as OMVs (outer membrane vesicles ou vesículas de membrana externa) primeiro é necessário estar familiarizado com a arquitetura padrão do envelope que bactérias gram-negativas produzem. Este envelope é formado por duas membranas uma interna e outra externa, uma camada de peptidoglicano, e o periplasma (Bos *et al.*, 2007), sendo que as membranas diferem na composição de lipídios e de proteínas. Na maioria das bactérias Gram-negativas, a monocamada externa da membrana externa (OM) é composta principalmente de lipopolissacarídeo (LOS), ao passo que o folheto interno e ambos os folhetos da membrana interna é composta por fosfolipídios. O espaço periplasmático, entre as duas membranas é responsável de 7 a 40% do volume total das células (Stock *et al.*, 1977, Koch, 1998, Collins *et al.*, 2007). Periplasma é um ambiente oxidante desprovido de qualquer fonte de energia conhecida

como ATP ou NADPH. Dentro do periplasma há uma fina camada de peptidoglicano rígida ligada a ambas as membranas por proteínas ancoradas à membrana (Kulp & Kuehn, 2008). Segue um esquema da membrana externa de bactérias gram-negativas (Figura 3).

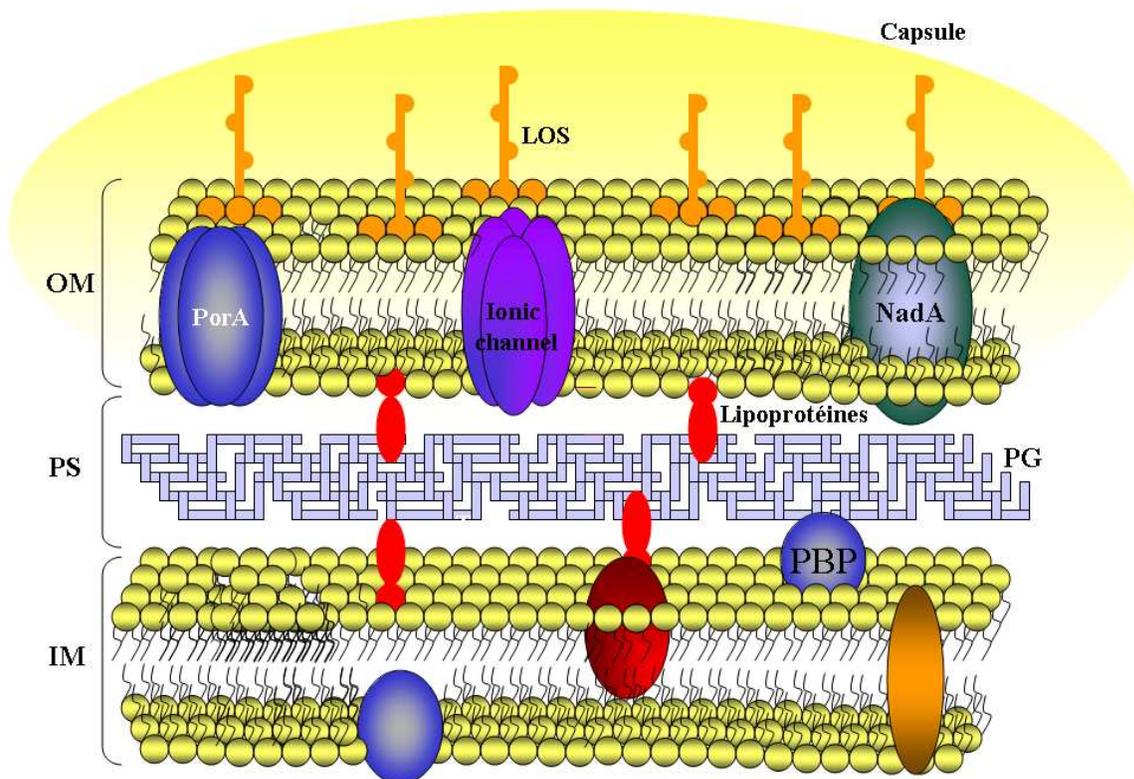


Figura 3: esquema da membrana externa de uma bactéria gram negativa que são apresentadas de fora pra dentro a membrana externa (OM), o espaço periplasmático (PS) e a membrana interna (IM). Em destaque estão algumas proteínas importantes para o uso vacinal em *Neisseria meningitidis* e o LOS (lipoligosacarídeo) molécula altamente imunogênica. (Varela et al., 2012)

A superfície das bactérias gram-negativas é responsável por diversas funções importantes, tais como a aquisição de nutrientes, a adesão, secreção de sinalização, e de

proteção do meio ambiente (Thompson *et al.*, 1985, Ciofu *et al.*, 2000). A importância do envelope é sublinhada pelo fato de que as rupturas em qualquer das suas camadas pode ser letal para a célula bacteriana (Kulp & Kuehn, 2008).

Bactérias gram-negativas liberam membrana externa e periplasma através da produção de OMVs (pequenas estruturas esféricas entre 20-250 nm de diâmetro). OMVs são produzidas quando pequenas porções de OM projetam-se para o exterior e se soltam da célula bacteriana. As proteínas solúveis são associadas às OMVs no periplasma e externamente como material aderente. Tais nanopartículas podem se disseminar longe da célula e transmitir funções biológicas no meio ambiente e em outras células, inclusive desempenhando um papel na patogênese, no *Quorum sensing*, aquisição de nutrientes e até transferência horizontal de genes (Grenier & Mayrand, 1987, Kolling & Matthews, 1999, Mashburn & Whiteley, 2005, Mayrand & Grenier, 1989, Renelli *et al.*, 2004, Yaron *et al.*, 2000). A produção de OMV é uma característica comum de todas as bactérias gram-negativas e, por causa do custo da energia implícito na substituição dos lipídios e proteínas perdidas acredita-se que a evolução por trás deste processo tenha acontecido por algum motivo ainda não elucidado (Kulp & Kuehn, 2008).

Como complexos secretados, de componentes da superfície bacteriana, insolúveis e, solúveis, as OMVs estão prontas para desempenhar sua função biológica de interação com o ambiente onde a bactéria está imersa. Uma característica importante das OMVs é que as proteínas associadas a elas exibem atividades biológicas (Grenier & Mayrand, 1987, Kadurugamuwa & Beveridge, 1996, Mayrand & Grenier, 1989, Thompson *et al.*, 1985). OMVs atuam como veículos de entrega de substâncias mais concentradas e protegidas, como agregadores na formação de biofilmes e como contribuintes para a sobrevivência das bactérias e virulência das mesmas (Furuta *et al.*, 2009, Schooling & Beveridge, 2006, McBroom & Kuehn, 2007).

Ainda, as OMVs são um sistema de entrega e de secreção de uma maneira que possibilitam a difusão de produtos bacterianos e a interação com o meio ambiente (Kulp & Kuehn, 2008). Assim como outros sistemas de secreção, as mediada por OMVs são reguladas temporalmente e espacialmente. Diferindo-se no entanto, dos mais bem estudados sistemas de secreção de proteínas solúveis em bactérias. Na secreção mediada por OMVs, material solúvel é liberado num complexo com e/ou rodeado por material insolúvel, já que este pode estar preso no core lipídico da membrana, ou no interior hidrofílico da nanopartícula. Por outro lado, as vias secretoras de materiais solúveis exportam monômeros específicos ou pequenos complexos proteicos, e a secreção não é acompanhada pela liberação de outros materiais celulares como acontece na secreção mediada por OMV, que se desprende com porções inclusive do periplasma bacteriano (Kulp & Kuehn, 2008).

Em bactérias patogênicas, proteínas integrais da membrana externa chamadas de adesinas são particularmente importantes na colonização dos tecidos do hospedeiro por elas mediar a coagregação (agregação de microrganismos da mesma espécie). Devido ao fato de as OMVs apresentarem complexos multivalentes de adesinas de membrana elas podem satisfazer este papel celular e auxiliar no desenvolvimento, por exemplo, de biofilme da placa dental (Grenier & Mayrand, 1987, Inagaki *et al.*, 2006).

O primeiro passo para a obtenção de uma OMV é a projeção da membrana externa da bactéria em direção ao meio extracelular. Isto implica que tais projeções sejam formadas em áreas onde as proteínas as quais fazem a ligação da OM com a camada de peptidoglicanos estejam ausentes. Isto pode ocorrer quando o peptidoglicano sofre ação de antibióticos ou auto lisinas (que são glicosidades, amilases, peptidases produzidas pelas bactérias e que participam da divisão celular) (Kadurugamuwa & Beveridge, 1996), resultando na liberação de OMVs contendo tanto fragmentos de peptidoglicanos quanto porções de proteínas de ligação entre estes e a OM (Figura 4).

Embora o modelo anteriormente citado represente um aumento da vesiculação que ocorre durante a ruptura do envelope, este não é o principal modelo. A vesiculação pode ser aumentada mais de 100 vezes sem afetar a integridade da membrana (McBroom & Kuehn, 2007), um feito difícil de se imaginar caso a camada de peptidoglicano esteja fortemente degradada. Outros eventos no envelope bacteriano podem desencadear o brotamento de OMVs, como por exemplo, ligações entre membrana externa e peptidoglicanos são movidas ou marcadas para destruição culminando em maior vesiculação e produção de vesículas (Kulp & Kuehn, 2008).

A simples relocação dos links entre OM e a camada de peptidoglicanos daria a vantagem de manter a integridade da membrana em geral, já que sempre haverá um certo nível destes links presentes mesmo que a vesiculação esteja sendo extremamente favorecida. No entanto, a simples remoção destas ligações não é suficiente para o mecanismo de formação da OMV, já que este não leva em consideração que a hiperexpressão e o desdobramento errôneo de proteínas periplasmáticas podem causar borbulhas na membrana e que algumas proteínas específicas estão em maior quantidade enquanto outras estão completamente excluídas em OMVs. Para a formação das OMVs, proteínas agregam-se na superfície interna da membrana externa, criando pressão nesta mas não resultando em brotamento até que as ligações entre a OM e a camada de peptidoglicanos sejam ou relocadas ou removidas da área como representado no esquema da Figura 4 (Kulp & Kuehn, 2008).

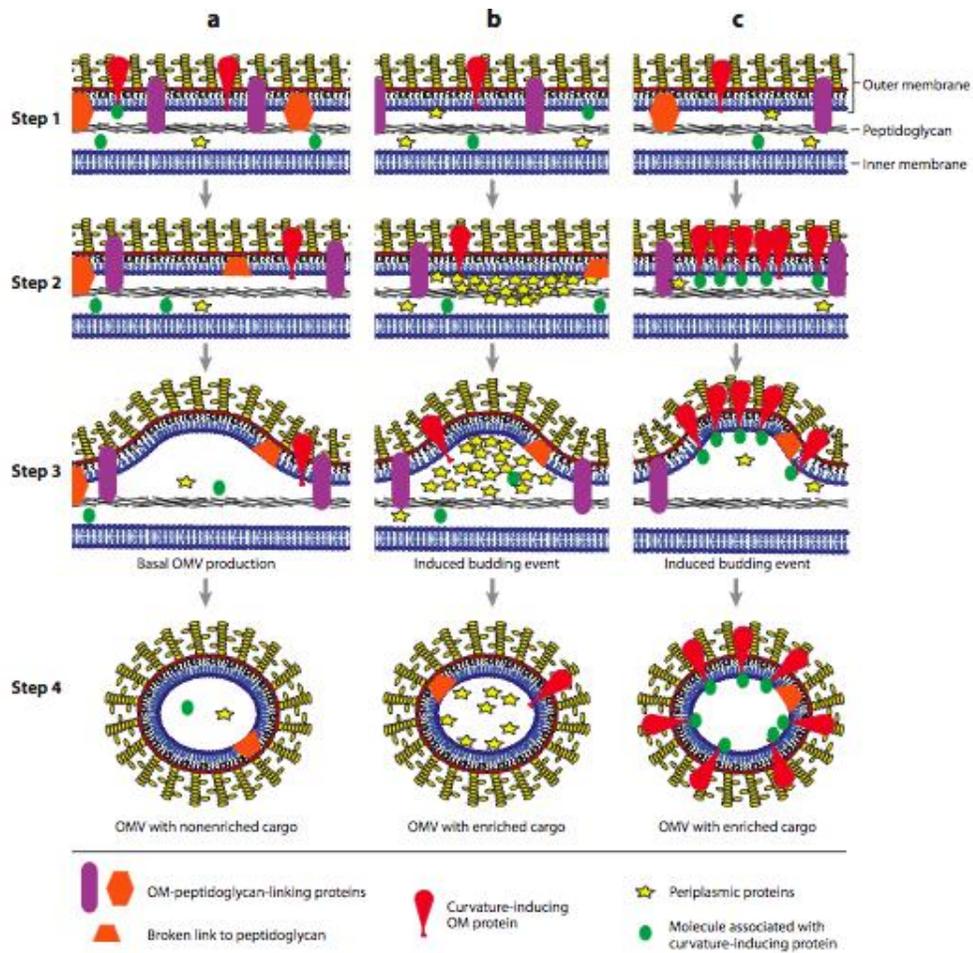


Figura 4: Esquema da biogênese de OMVs. (a) Produção de OMVs por vesiculação da OM pela ausência de proteínas que ligam a OM com a camada de peptidoglicanos. (b) Acúmulo de proteínas periplasmáticas na parte interna da OM e deslocamento das proteínas de ligação entre OM e PS. (c) Vesiculação por acúmulo de moléculas associadas a indução de curvatura da membrana externa e a remoção das ligações OM e PS. (Kulp & Kuehn, 2008).

Modelo Experimental Neuronal - Células NG97

As neoplasias primárias do sistema nervoso central representam 2% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas e 20% dos cânceres em criança com idade inferior a 15 anos (Ellison, 1998). Dentre estes, a grande maioria é originada a partir de células da glia, sendo então chamados de gliomas (Kleihues & Cavenee, 1999). Os gliomas fazem parte de um grupo heterogêneo de neoplasias que podem ser dividido de acordo com a célula da glia que a deu origem, por exemplo, as neoplasias de origem astrocíticas são denominadas astrocitomas, podendo ainda haver neoplasias mistas (Ellison, 1998).

A linhagem celular NG97 foi estabelecida a partir de uma amostra de tumor cedida pelo departamento de Neurocirurgia da UNICAMP, pouco após uma cirurgia de uma homem de 66 anos de idade diagnosticado com glioblastoma multiforme do lobo temporal direito. Exames histológicos revelaram ser um astrocitoma grau III de acordo com a classificação da organização mundial da saúde.

Dentre as neoplasias astrocíticas, os glioblastomas dividem com o astrocitoma e o astrocitoma anaplásico, um conjunto de células que abrangem um espectro de lesões de malignidade progressiva, que compartilham alterações genéticas e a propensão de invadir tecido nervoso adjacentes de forma difusa (Ellison, 1998).

Existem várias vantagens de se obter uma cultura de célula imortalizada para estudos de neoplasias, como por exemplo, um estoque inesgotável de células para estudo quando utilizados adequadamente. Há também, em alguns casos, a possibilidade de transplantes de células permanentes para modelos animais, facilitando o estudo da interação hospedeiro-tumor em relação a mecanismos fisiopatológicos básicos, tais como progressão, invasão e análise de possíveis moléculas terapêuticas (Grippo *et al.*, 2001)

OBJETIVOS

- Verificar a viabilidade da técnica de ultrafiltração em membranas de nitrocelulose para a produção de vesículas de membrana externa através da análise do tamanho e carga superficial das partículas.
- Analisar a interação da linhagem celular NG97 (derivada de um astrocitoma grau III) com OMV extraídas de diferentes linhagens da bactéria *Neisseria meningitidis*, tendo em vista que tal bactéria causa patologias principalmente no tecido neural.
- Averiguar as mudanças morfológicas nas células NG97 pós contato com vesículas de membrana externa extraídas de diferentes linhagens de *N. meningitidis*.
- Analisar a produção de citocinas inflamatórias em resposta à infecção de células NG97 por OMV provenientes de *Neisseria meningitidis*.

METODOLOGIA

Meios de Cultivo Bacteriano

Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar

O pó foi reconstituído na proporção de 37g por litro de água seguindo as especificações do fabricante (Acumedia Lansing, Michigan, USA). Para o preparo do BHI Ágar, adicionou-se 1,5 % de ágar ao meio de cultura líquido antes da esterilização pelo calor úmido (autoclave). Esterilizou-se o meio de cultivo em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Ágar Chocolate

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

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 meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após isso, a uma temperatura de 56 °C adicionou-se o suplemento abaixo descrito, sendo este esterilizado por filtração.

Suplemento

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

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 desionizada q.s.p.	1000 mL

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

Meios de Cultivo Celular para a linhagem celular NG97

Meio RPMI 1640 (Cultilab Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10-20 % de Soro Fetal Bovino (SFB).

Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento

Todas as linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas no presente trabalho e suas origens estão descritas na Tabela 1. As linhagens de *Neisseria meningitidis* foram cultivadas utilizando-se a técnica de esgotamento em ágar chocolate a 37 °C com 5% de CO₂ por um período de 18-24 horas. Para o cultivo dos meningococos, utilizou-se também, sob as mesmas condições, o meio GC.

Para o crescimento da linhagem de *E.coli* DH5 α foram utilizados os meios LA e LB, dependendo da necessidade sem antibiótico e incubados à 37 °C por 18-24 horas.

Para sua manutenção, as amostras foram suspensas em BHI com 30 % de glicerol 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> P374	Sorogrupo Y, líquido, Campo Grande - RJ, Brasil	INCQS
<i>E.coli</i> DH5 α	Nal ^R utilizada como receptora de plasmídeos. 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

Construção dos mutantes *Neisseria meningitidis*

Soluções para extração de DNA Genômico

Solução de CTAB/NaCl

Pesaram-se 8 g de brometo de cetramônio (CTAB) (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), concentração final.

Tris-HCl10 mM

EDTA1,0 mM

Extração de DNA genômico

O DNA genômico bacteriano foi extraído de colônias de *N. meningitidis* crescidas em ágar chocolate por 18 horas, incubadas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. A suspensão bacteriana foi feita em 400µL de tampão TE pH 8,0 para uma D.O. 600nm = 2,00 (Sambrook & Gething, 1989). Em seguida, adicionou-se 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. Transcorrido o tempo colocou-se 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). Agitou-se o microtubo até a formação de um líquido de aspecto leitoso. Formada essa mistura, a mesma foi incubada a 65 °C por mais 10 minutos. Adicionaram-se 750µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (v/v) e o microtubo novamente foi agitado vigorosamente por cerca de 10 segundos em vortex. Centrifugou-se o material a 12000 RPM ou 10,625 xg, sendo o sobrenadante aquoso (600 µL) cuidadosamente transferido para outro microtubo e, o DNA precipitado com 0,6 volumes de isopropanol -20°C. A solução foi mantida à temperatura de -20°C por

30 minutos, em seguida foi centrifugada a 12000 RPM ou 10,625 xg 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 quantificação do DNA realizou-se como descrito por Sambrook *et al.* (1989), onde a concentração e pureza foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 e 280nm. O ácido nucléico extraído foi conservado à temperatura de -20°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR).

As sequencias dos genes estudados *pilE* e *synA* foram obtidas através do GenBank GI:861062 contida no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para amplificação dos genes foi utilizado como precursor o DNA genômico da linhagem *N. meningitidis* C2135 como DNA *template*, utilizando os inicializadores presentes na tabela 2.

Tabela 2 - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados no trabalho, em negrito segue o sítio de restrição da enzima BamHI

Nome do Primer	Sequência do Inicializador (5' → 3')
synA forward	CGACTTCGGCAAGCTAAAACCT
synA reverse	TTCTAAACGGTCGCCGTGAATC
ermAM forward	GCAAACCTTAAGAGTGTGTTGATAG
ermAM reverse	AAGCTTGCCGTCTGAATGGGACCTCTTTAGCTTCTTGG
pilEi forward	CGAGCTGATGATTGTGATTGCC
pilEi reverse	GACGCTTGGCCCACAGGGAGAG
pilEf forward	GGATCC CTCTCCCTGTGGGCCAAG
pilEf reverse	GCTGGCATCACTTGCGTCGCGG

Para cada reação foi utilizado um volume final de 50 μ L. Contendo 2 μ L do DNA *template* (DNA total extraído da cepa C2135), 50 moles de cada inicializador, 1x da Solução Tampão 10x (Invitrogen, USA), 2mM de MgCl₂ (Invitrogen, USA) e, 2,5U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, USA). Posteriormente o microtubo 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''

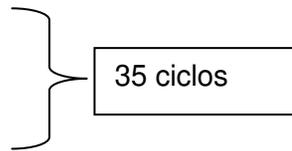
92 °C - 30''

55°C – 1'

68 °C – 40''

72 °C – 10'

4 °C - ∞



pilEi

94 °C – 5'

47°C- 2'

68 °C- 1'40''

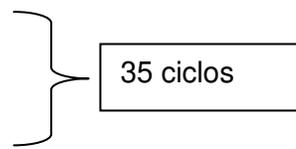
92 °C - 30''

47°C – 2'

68 °C – 1'40''

72 °C – 10'

4 °C - ∞



synA

94 °C – 5'

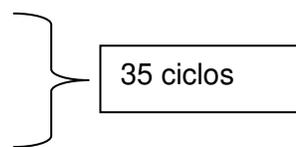
92 °C – 1'

52 °C – 1'

72 °C – 1'

72 °C – 7'

4 °C - ∞



A visualização dos fragmentos amplificados realizou-se 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 Azul de Bromofenol 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*.

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

Para inserção dos genes amplificados no plasmídeo foi realizado a seguinte reação:

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

A mistura foi incubada a 16°C, por um período de 16-18 horas. Para confirmação da ligação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose como já descrito acima

Transformação em Células Competentes de Escherichia coli

Preparo de Células competentes de DH5-α

A linhagem de *E. coli* DH5α 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 ou 1.180 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido 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 CaCl₂ 100 mM adicionada de 30% de glicerol esterilizado. A suspensão foi aliqotada em tubos eppendorf (alíquotas de 500 µL) e congelada em nitrogênio líquido e, posteriormente, conservada a -80°C (Sambrook & Gething, 1989).

Processo de Transformação em Escherichia coli linhagem DH5-α

Uma alíquota de 200 µL de células competentes foi descongelada rapidamente e adicionadas o 10 µL da ligação. A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. Transcorrido esse período a mistura foi submetida à temperatura de 42°C durante o tempo limite de 90 segundos. Transcorrido tal tempo, o tubo de reação foi imediatamente transferido para um banho de gelo por 3 minutos. Foram adicionados à mistura 800 µL 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 de 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 µg/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 contém o plasmídeo desejado, logo após foi submetida a extração de DNA plasmidial em média escala (Sambrook & Gething, 1989).

Extração de DNA Plasmidial em Média Escala

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 autoclavadas 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 desionizada qsp.....100,0 mL

Solução III

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

Ácido acético glacial.....11,5 mL

Água desionizada.....28,5 mL

Tampão PBS

NaCl.....	8,00 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	0,61 g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Água desionizada q.s.p.....	1,0 L

Esterilizou-se a 127 °C por 15 minutos.

Metodologia de extração plasmidial em média escala

O método utilizado para extração de DNA plasmidial baseou-se na técnica de lise alcalina de Birboin & Doli (1979). A linhagem bacteriana de interesse foi inoculada em 50 mL de meio LB, 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. A suspensão bacteriana foi transferida para um tubo de centrifuga e centrifugado a 5000 rpm ou 1,844 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as bactérias ressuspensas 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 e então, novamente, invertidos suavemente e mantidos em banho de gelo por mais 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10000 RPM ou 7,378 xg por 5 minutos e 20 mL do sobrenadante transferidos para outro tubo de centrifuga 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 ou 10,625 xg por 5 minutos, ressuspensado em 400 µL de água desionizada 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 ressuspendido com 400 µL água MiliQ esterilizada. Para confirmação da eficiência da extração o DNA plasmidial obtido foi analisado através de uma eletroforese em gel de agarose 2%.

Inserção do gene de resistência a Eritromicina

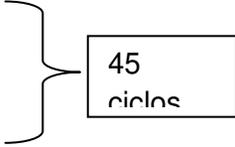
Depois de realizada a extração do plasmídeo de interesse em média escala, o plasmídeo foi digerido com enzima de restrição (*Bam HI* no gene da pilina e *Xho I* no gene da cápsula), sendo necessário a presença de um único sítio de restrição na porção central do gene a ser nocauteado seguindo a reação:

Plasmídeo de interesse.....	5 µL
Enzima de restrição.....	2 µL
Tampão Enzima 10Xconc.....	1 µL
Água deionizada q.s.p.....	10 µL

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 reação em cadeia da polimerase.

Uma PCR, utilizando os *primers ermAM forward* e *ermAM reverse*, com suas respectivas sequências nucleotídicas presentes na tabela 2, foi realizada para amplificação do cassete de resistência de Eritromicina, *ermAM*, seguindo a metodologia descrita na seção reação em cadeia da polimerase. As temperaturas utilizadas no termociclador foram:

94 °C – 5'
 50°C- 1'
 72 °C- 1'
 92 °C - 1'
 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 reação em cadeia da polimerase. Após linearização do plasmídeo pela digestão com enzima de restrição, foi inserido o cassete de resistência a eritromicina (*ermAM*) através de uma ligação com enzima T4 ligase, seguindo a seguinte reação:

Plasmídeo digerido com enzima de restrição.....	2 µL
Amplificado <i>ermAM</i>	10 µL
T4 DNA Ligase (1U/µL).....	2 µL
Tampão 5X.....	4 µL
Água Desionizada q.s.p.....	20 µL

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

Processo de Transformação do plasmídeo contendo dois genes de resistência 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 reação em cadeia da polimerase.

Processo de "knock-out" utilizando pGem®-T Easy (Promega) em *Neisseria meningitidis* linhagem C2135

A construção em pGem®-T Easy (Promega) contendo o gene a ser inativado *pilE* ou *synA* 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 aliqüotada em volumes de 100 μ L em uma placa de cultivo celular de 24 poços. Alíquotas de 5 μ L contendo 5 μ g do plasmídeo a ser transformado foram adicionados à 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 μ L 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 O_2 , durante 24-48 horas até o aparecimento das colônias visíveis (Taha *et al.*, 1998).

Método de extração da vesícula de membrana externa (OMV)

A extração da OMV foi realizada utilizando a metodologia de extração por ultrafiltração. As linhagens de interesse foram crescidas previamente e transferidas para garrafas de Roux contendo meio de cultura GC (meio de cultura específico para *Neisseria meningitidis*) em seu interior. As bactérias crescidas nas garrafas foram suspensas em PBS e posteriormente centrifugadas a 4000 rpm ou 1,180 xg/10 minutos.

O sobrenadante que resultou da centrifugação foi transferido e filtrado a vácuo através de uma membrana de celulose MILIPORE® com porosidade de 0,022 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.

Segue um esquema de como foi feita a extração das vesículas de membrana externa.



Figura 5: esquema da produção e extração de vesículas de membrana externa de bactérias gram-negativas.

Caracterização das OMVs

Para caracterizar as nanopartículas obtidas dos meningococos foram utilizadas quatro metodologias: microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento de luz dinâmico (zetasizer nano), mobilidade eletroforética (zetasizer nano) e dosagem do conteúdo proteico pelo teste de Bradford.

Para a microscopia eletrônica foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E a uma voltagem de 60 kV. Como suporte para amostras foram utilizados *grids* com filme suporte formar 2,5% diluído em dicloroetano e recoberto com filme de carbono. Como contrastante foi utilizado acetato de uranila.

O espalhamento de luz dinâmico (que permitiu determinar o tamanho de nanopartículas) e a mobilidade eletroforética das mesmas (com a finalidade de obtenção da carga superficial das vesículas de membrana externa) foi feito em um equipamento Zetasizer nano disponibilizado gentilmente pela professora Dr. Daniele Ribeiro de Araújo – UFABC. Cada gráfico da distribuição dos tamanhos de cada linhagem analisada foi oriundo de uma triplicata, e quando se observar três gráficos foi referente a diluições seguidas de filtrações das mesmas para eliminação de impurezas e partículas muito maiores que pudessem dificultar a análise.

Para o teste de Bradford (Bradford, 1976), utilizou-se a soro albumina bovina (BSA) para fazer a curva padrão. Para tal foi utilizado o Reagente Corante Concentrado BioAgency® (cod. 500-0006N) e a leitura foi realizada à 595 nm. 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. A concentração das OMVs obtidas por esse processo se baseia pela sua concentração proteica.

Cultivo Celular da linhagem NG97

A linhagem celular NG97 (neuroglioblastoma humano, cedida pelo do laboratório da Profa. Dra. Liana Verinaud – Depto de Imunologia – IB - UNICAMP) foi cultivada em meio RPMI 1640 (Cultilab Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10-20% de Soro Fetal Bovino (SFB), dependendo do crescimento celular até o momento (menor porcentagem era adotada para um maior número de células já que neste há fatores que induzem a proliferação celular), e mantidas à 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂. Após a confluência da monocamada celular, as células foram tripsinizadas e distribuídas em placas de 24 poços. A concentração celular obtida após a tripsinização era de 1.10⁶ células/mL. Cada poço recebeu uma alíquota de 1 mL da suspensão celular. As placas

em questão foram incubadas sob as mesmas condições supracitadas até atingirem confluência da monocamada celular.

Teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho- Neutro

O teste foi previamente descrito por Borenfreund em 1985 (Borenfreund & Shopsis, 1985). Após incubação das células NG97 com as OMVs (concentração final proteica de 1,21 µg/ml) por 3 horas o meio foi removido e a cultura lavada com salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4. Para cada poço, foram adicionados 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 os poços foram lavados rapidamente com solução de formol-cálcio para fixação. Logo após, 0,2 mL de solução de etanol-ácido acético foram adicionados a cada poço e a placa foi mantida por 15 minutos para lise. O corante solubilizado foi quantificado em espectrofotômetro a 540 nm.

Análise morfológica de culturas celulares após infecção com OMVs de *N. meningitidis*

A análise morfológica de células NG97 foi realizada através de lâminas de microscopia óptica. Para isso, lamínulas estéreis foram colocadas no fundo dos poços de placas de 24 poços, nas quais as células foram semeadas e cultivadas até a confluência da camada celular.

Após o processo de infecção por OMVs de *N. meningitidis*, descrito no tópico Teste de viabilidade celular por coloração com vermelho-neutro, o meio de cultura celular foi descartado e as placas foram lavadas 5 vezes com RPMI 160 estéril. A seguir, as lamínulas foram submetidas à coloração de eosina-azul de metileno segundo Wright (Solução de Corante de Wright – Nalgon, Itupeva, São Paulo, Brasil) e montadas sobre

lâmina óptica seca com Entellan®/MERCK. Tal procedimento permitiu a visualização em microscopia óptica das alterações e morfológicas que as OMVs causaram nas células.

A partir das lâminas obtidas através do ensaio de análise morfológica, foi possível a visualização das alterações morfológicas causadas às células *in vitro* em microscopia óptica. Para determinar se houve alteração morfológica significativa nas células submetidas à infecção, observou-se as lâminas em microscopia de luz com objetiva de 100 X e foi realizado o seguinte procedimento: a cada 100 células, contou-se aquelas que apresentaram alteração morfológica. Os campos, três no total, de visualização para contagem de células foram escolhidos de maneira aleatória.

Considerou-se como alteração morfológica aspectos como citoplasma mais denso, formação de expansões citoplasmáticas como vesículas (“blebs”), modificações quanto ao formato da própria célula e presença excessiva de vacúolos.

Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias por PCR em Tempo Real

Extração de RNA

Células NG97 foram cultivadas em placas de 24 poços e foram submetidas ao processo de infecção por OMVs de *N. meningitidis* descrito no tópico teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho-Neutro. Após um período de 3 horas, o meio de cada poço foi retirado e foram adicionados 300 µL de Trizol Reagent® (Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, USA) por poço. Com o auxílio de uma ponteira de micropipeta estéril, o conteúdo total de extração de cada poço foi retirado e transferido para um eppendorf de 1,5 mL livre de RNase. A cada amostra foi adicionado um volume de 200 µL de clorofórmio, agitada e incubada 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras, então, foram centrifugadas a 10000 rpm ou 7,378 xg a 4 °C por 15 minutos. Após a centrifugação, são formadas 3 fases: uma fase superior aquosa com RNA, uma interface e outra orgânica, ambas com DNA e proteínas. A fase que continha RNA foi transferida para um novo eppendorf livre de RNase. Adicionou-se uma alíquota de 500 µL de isopropanol a cada tubo e estes

foram incubados a -20 °C por 30 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm ou 10,625 xg a 4 °C por 10 minutos e, posteriormente, os sedimentos foram lavados com 500 µL de etanol 70 %. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 rpm ou 10,625 xg em um período de 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após a evaporação do álcool, os pellets foram ressuspensos em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato 0,01 % v/v) e conservado à -80 °C.

PCR em tempo real quantitativo (qRT – PCR)

Uma quantidade de 0,3 µg de RNA extraído foi submetido à reação de PCR em tempo real quantitativo, utilizando oligonucleotídeos para genes endógenos para GAPDH e como genes alvo TNF α , TGF β , IFN γ , IL-6, IL-8 e IL-10 (oligonucleotídeos descritos na tabela 3). Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit qRT – ONE STEP- SuperScript III (Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, USA) e para a reação de quantificação relativa o 2X SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, WA, UK).

Tabela 3: oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Citocinas	Oligonucleotídeos (5' → 3')
TNF α	FW: TCTTCTCGAACCCCGAGTGA RV: CCTCTGATGGCACCACCAG
TGF β	FW: CAGCAACAATTCCTGGCGATA RV: AAGGCGAAAGCCCTCAATTT
INF γ	FW: GGCTGTTACTGCCAGGACCCATATGT RV: GATGCTCTTGACCTCGAACAGCAT
IL-06	FW: GAGGATACCACTCCCAACAGACC RV: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
IL-08	FW: ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT RV: TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAA
IL-10	FW: GTGA TGCCCAAGCTGAGA RV: CACGGCCTTGCTCTTGTTT
GAPDH	FW: TGCACCACCAACTGCTTAGC RV: GGCATGGACTGTGGTCATGAG

As reações foram efetuadas em placas de 96 poços no ONE STEP PLUS (Applied Biosystems), nas condições de 50 °C/15 min (para a ação da transcriptase reversa), seguindo de 45 ciclos de 95 °C/15 s, 60 °C/1 min, de acordo o meio de reação abaixo descrito:

Master Mix SYBR Green 2X.....	5 µl
qRT – ONE STEP- SuperScript III.....	0,25 µl
<i>Primer Forward</i> (concentração final 400µM).....	0,08 µl
<i>Primer Reverse</i> (concentração final 400µM).....	0,08 µl
RNA extraído (concentração final de 30 ng).....	1 µl
H2O DEPC q.s.p.....	10 µl

A análise dos resultados foi realizada pelo método de comparação de expressão do gene endógeno GAPDH, de tal modo que o Ct (threshold cycle – ciclo no qual a fluorescência emitida pelos produtos da reação de amplificação passa a ser estatisticamente significativa) do gene alvo de cada quimiocina (início do ciclo de amplificação de cada gene) foi comparado ao Ct obtido do controle negativo celular do gene endógeno não infectado, gerando o Δ Ct o qual foi subtraído do Ct obtido de cada gene de interleucina de células infectadas por diferentes linhagens bacterianas, gerando assim o valor de $\Delta\Delta$ Ct. A razão da expressão desses valores é expressa nos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$, que fornece a expressão de cada quimiocina expressa em cada tipo celular frente a infecção bacteriana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Construção das cepas "knock-outs"

C2135 Δ *synA*

Segue o esquema de como foi realizado o knock-out da linhagem C2135 de *Neisseria meningitidis* para o gene *synA*.

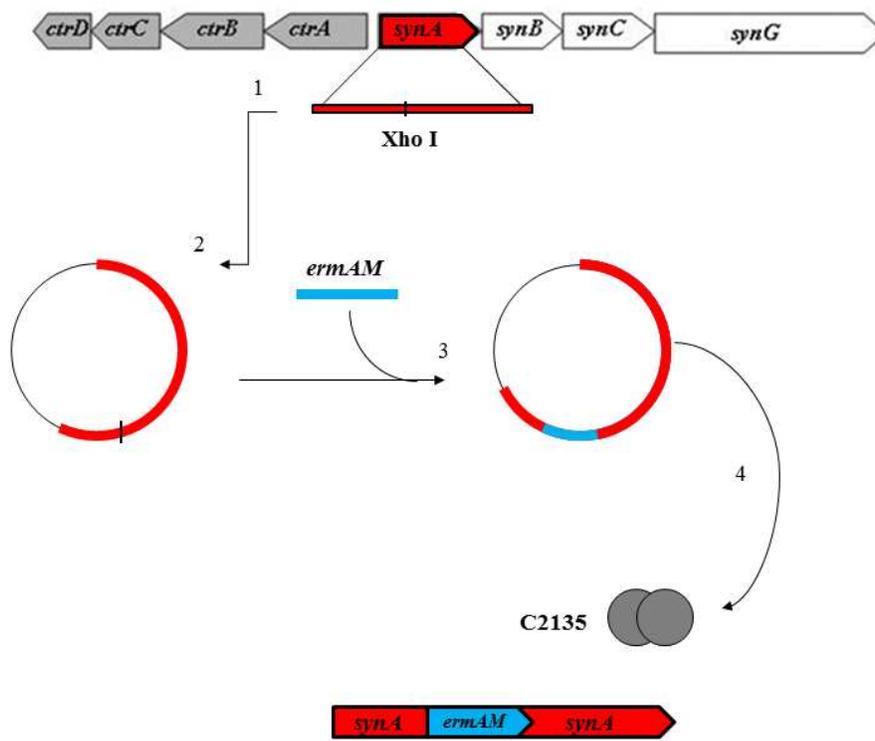


Figura 6: (1) Amplificação do gene *synA* que possui um sítio de restrição para a enzima de *Xho I*; (2) Inserção do gene amplificado no vetor de clonagem pGem®-T Easy (Promega) e a consequente quebra da sequência do gene *synA* no sítio de restrição *Xho I*; (3) adição do cassete de resistência a eritromicina *ermAM* no plasmídio pela atuação da T4 DNA ligase; (4) inserção do plasmídio na linhagem C2135.

A confirmação do “knock-out” foi feito por amplificação do cassete de resistência a eritromicina nas linhagens mutadas, presente na figura 7.

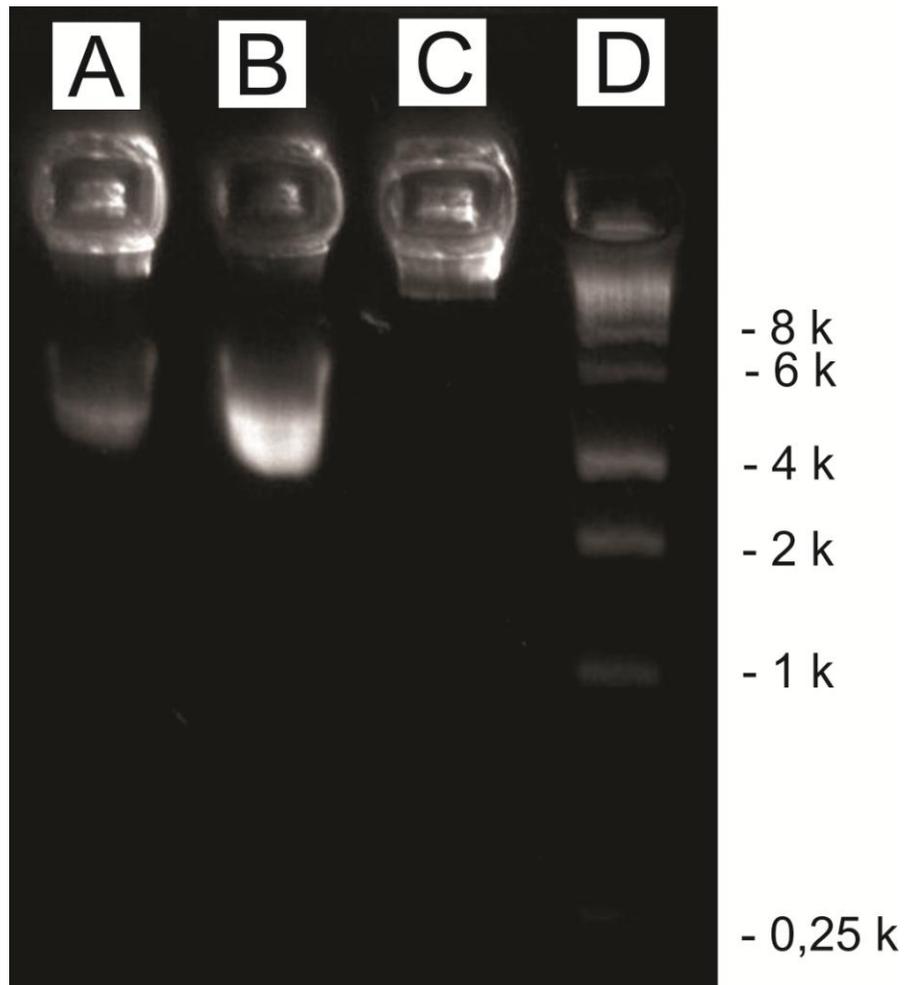


Figura 7: (D) Ladder de 1kb; (C) amplificação do cassete de resistência da cepa C2135; (B) controle positivo *ermAM*; (A) amplificação do cassete de resistência da cepa C2135 $\Delta synA$.

C2135 $\Delta pilE$

Segue o esquema de como foi realizado o knock-out da linhagem C2135 de *Neisseria meningitidis* para o gene *pilE*.

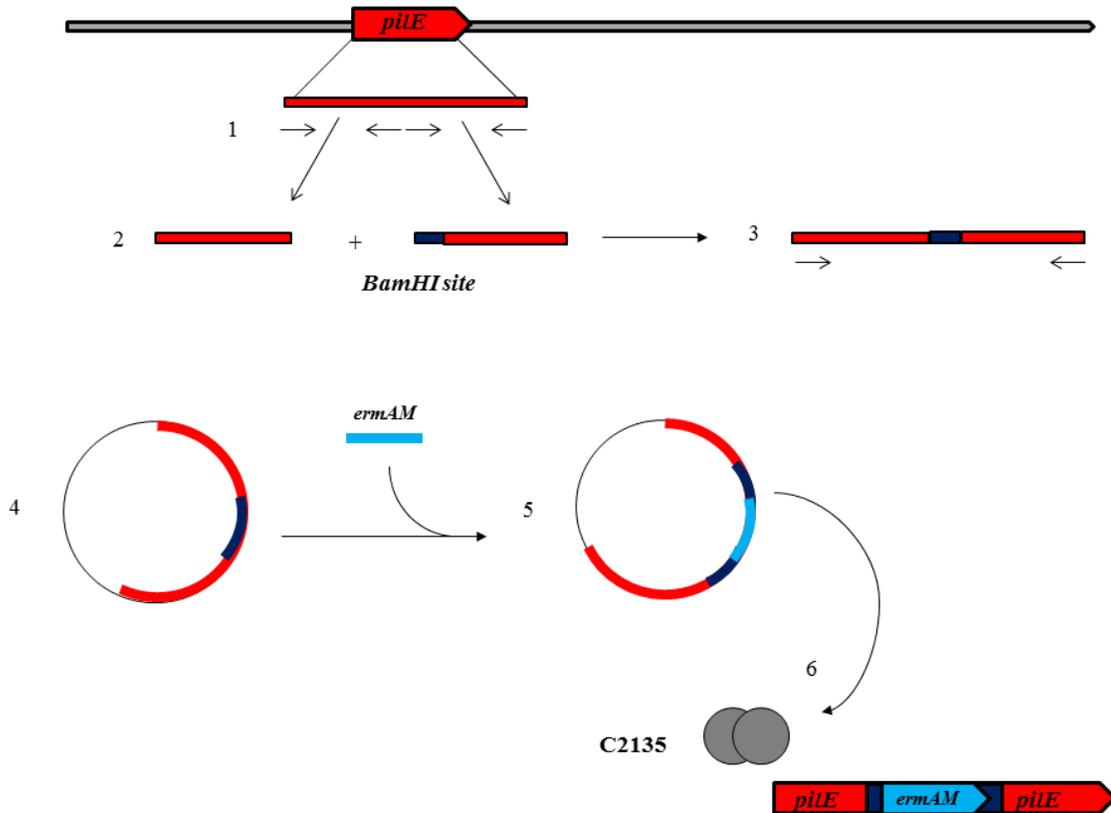


Figura 8: (1) amplificação em duas partes do gene com a inserção do sítio da enzima de restrição *Bam*HI; (2) linearização dos dois fragmentos por reação de PCR utilizando o oligonucleotídeo do primeiro fragmento e o oligonucleotídeo do segundo fragmento; (3) fragmentos linearizados com o sítio de restrição para *Bam*HI; (4) inserção do fragmento no vetor de clonagem pGem®-T Easy (Promega) e sequente abertura com a enzima de restrição previamente mencionada; (5) inserção do cassete de resistência a eritromicina *ermAM*; (6) inserção do plasmídeo na linhagem C2135.

A confirmação do knock-out foi feito pela perda da capacidade da cepa mutada de sofrer mutação, já que a pilina, proteína codificada pelo gene *pilE*, é responsável pela

característica da bactéria de internalizar DNA exógeno, ou seja, é responsável por esta ser naturalmente transformável.

Caracterização das OMVs

Microscopia eletrônica de transmissão

As microscopias eletrônicas foram usadas para averiguar o tamanho das OMVs, para posteriormente serem confirmados por zetasizer nano (Berlanda Scorza *et al.*, 2008), nesta foram verificadas vesículas de no máximo 200nm, que foram posteriormente confirmados pelos resultados que serão mostrados na seção espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletrosférica.

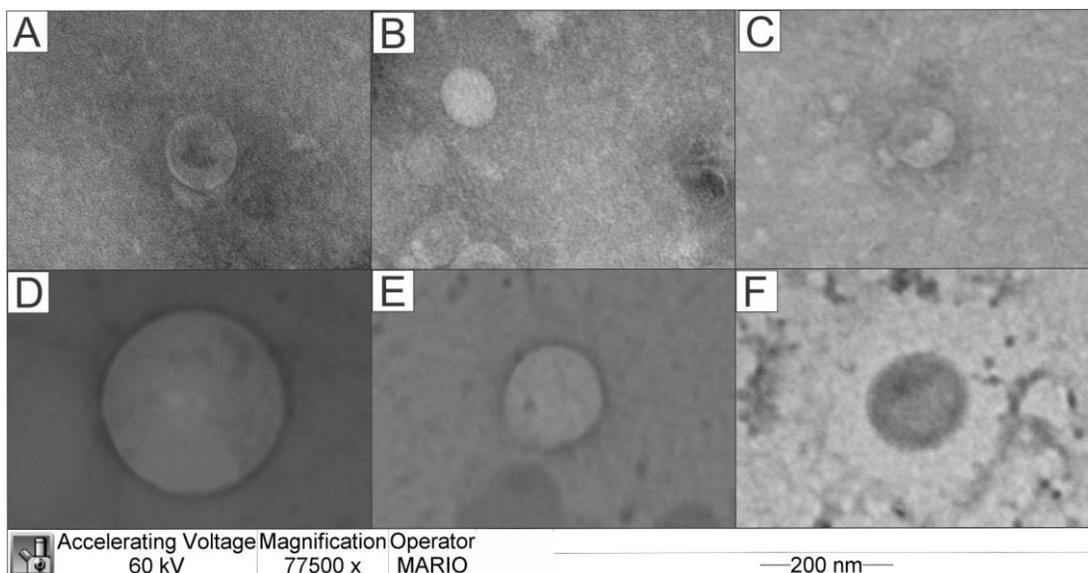


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão das vesículas de membrana externa analisadas neste trabalho provenientes de 6 diferentes linhagens de *N. meningitidis*. (A) OMV extraída da cepa B4;(B) OMV extraída da cepa C2135;(C) OMV extraída da cepa C2135 $\Delta pilE$;(D) OMV extraída da cepa P2143;(E) OMV extraída da cepa P374;(F) OMV extraída da cepa C2135 $\Delta synA$.

Espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética.

C2135

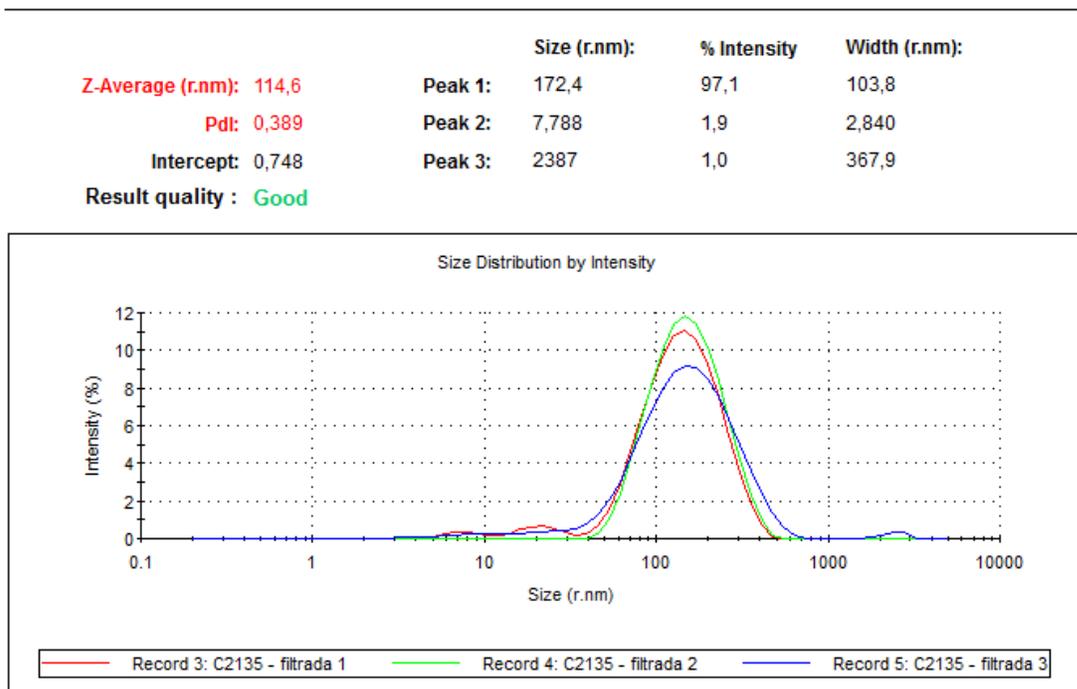


Figura 10: Distribuição das OMVs extraídas da cepa C2135 em tamanho.

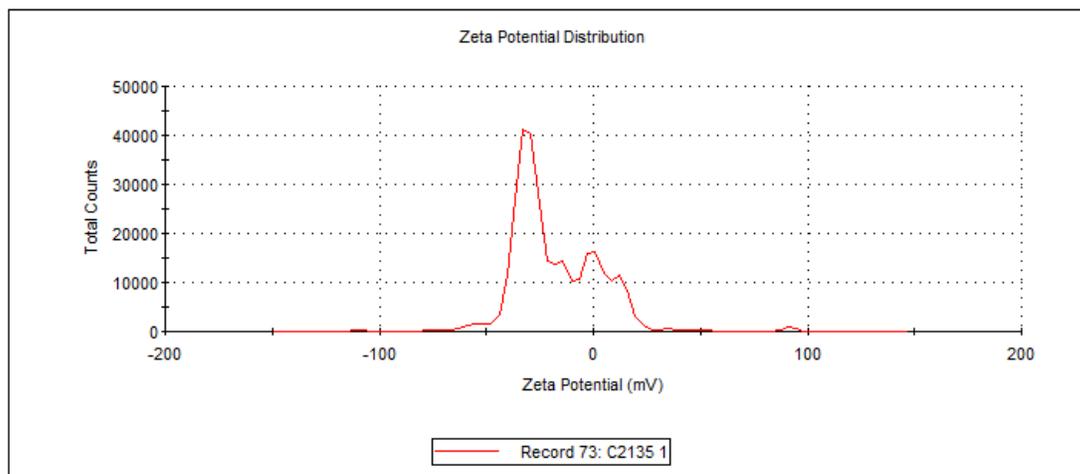
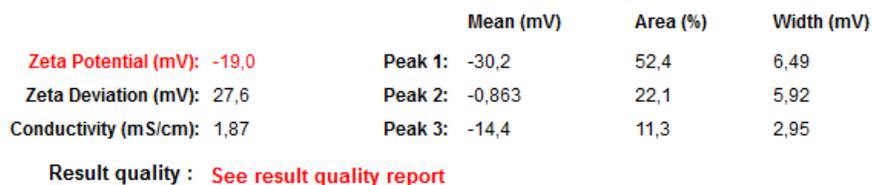


Figura 11: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa C2135.

C2135ΔpilE

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 71,76	Peak 1: 96,55	100,0	49,61
Pdl: 0,248	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,880	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

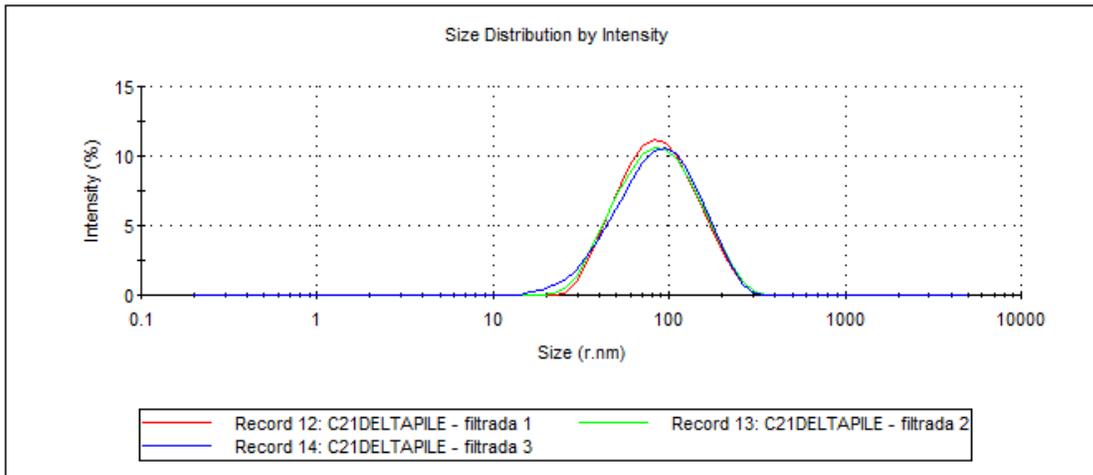


Figura 12: Distribuição das OMVs extraídas da cepa C2135 ΔpilE por picos e tamanhos.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -26,0	Peak 1: -32,1	70,1	7,54
Zeta Deviation (mV): 13,0	Peak 2: -4,47	17,3	4,70
Conductivity (mS/cm): 1,78	Peak 3: -14,7	12,5	2,86

Result quality : Good

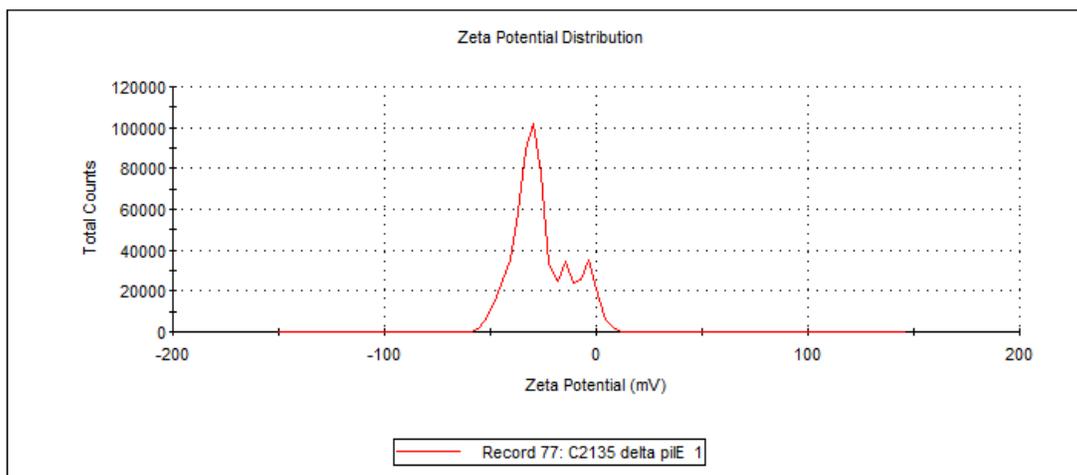


Figura 13: Potencial zeta em (mV) da OMV da cepa C2135 ΔpilE.

C2135 Δ synA

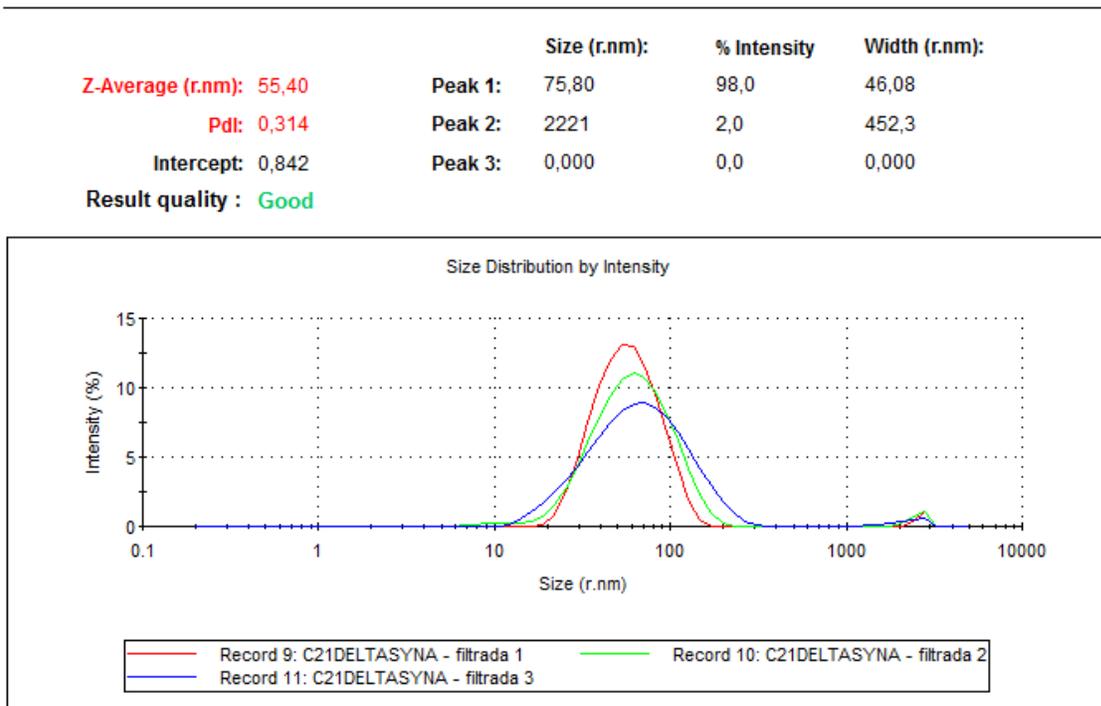


Figura 14: Distribuição das OMVs extraídas da cepa C2135 Δ synA por picos e tamanhos.

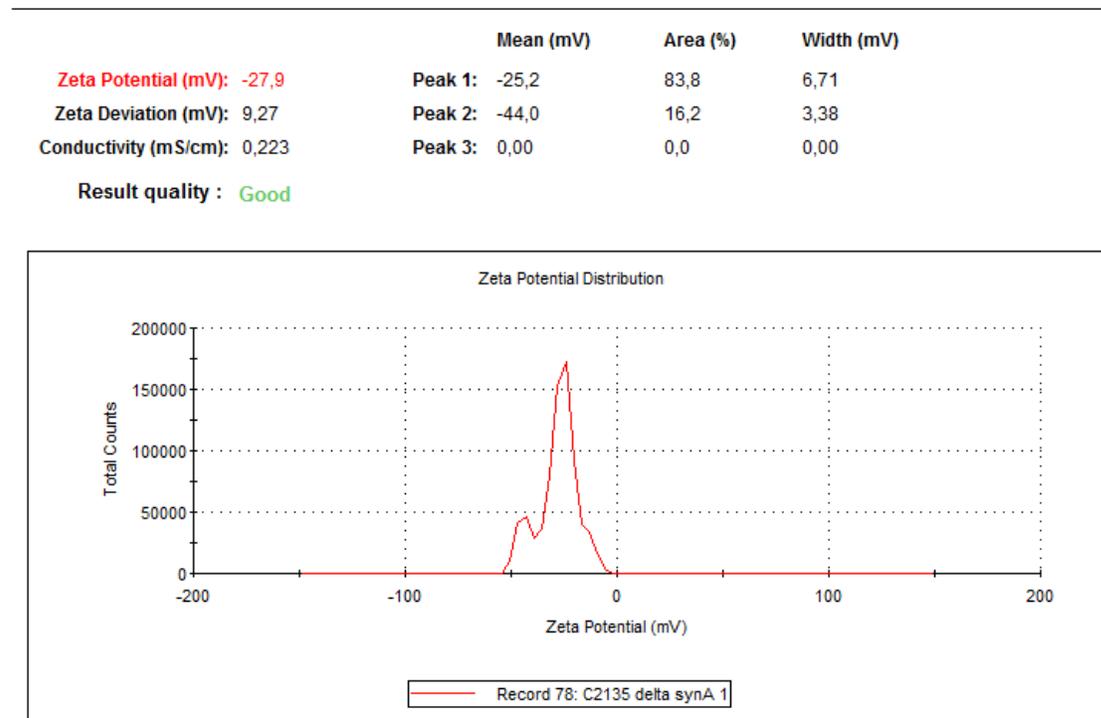


Figura 15: Potencial zeta em (mV) da OMV da cepa C2135 Δ synA.

B4

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 882,2	Peak 1: 84,91	100,0	15,09
Pdl: 1,000	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,263	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

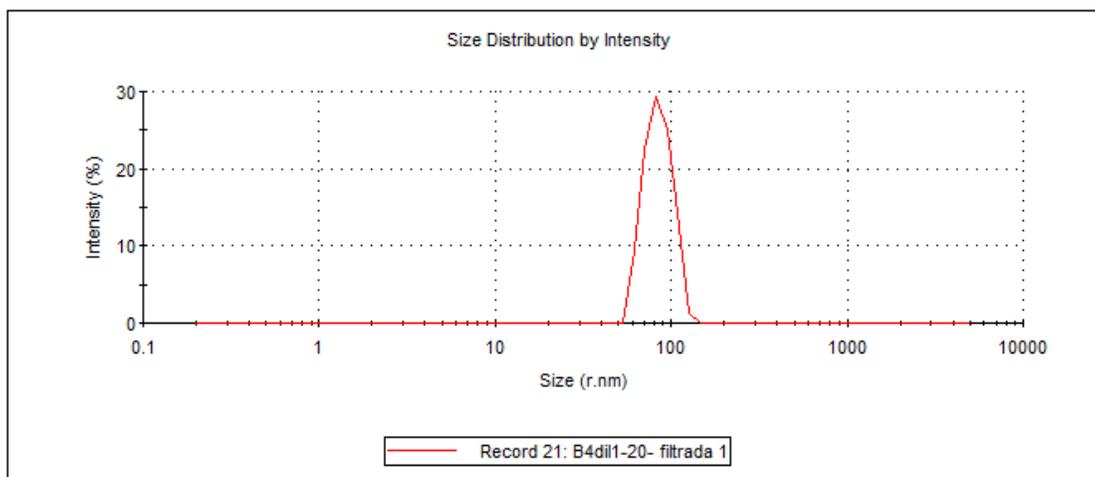


Figura 16: Distribuição das OMVs extraídas da cepa B4 por picos e tamanhos.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -15,5	Peak 1: -15,5	100,0	6,60
Zeta Deviation (mV): 6,60	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,143	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

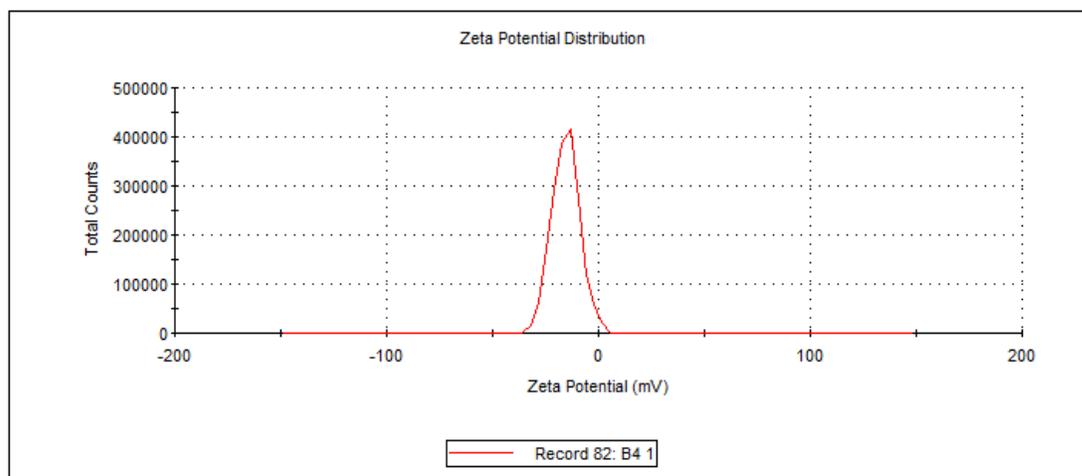


Figura 17: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa B4.

P374

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 66,66	Peak 1: 78,46	98,2	38,91
Pdl: 0,288	Peak 2: 2610	1,8	231,4
Intercept: 0,727	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Refer to quality report

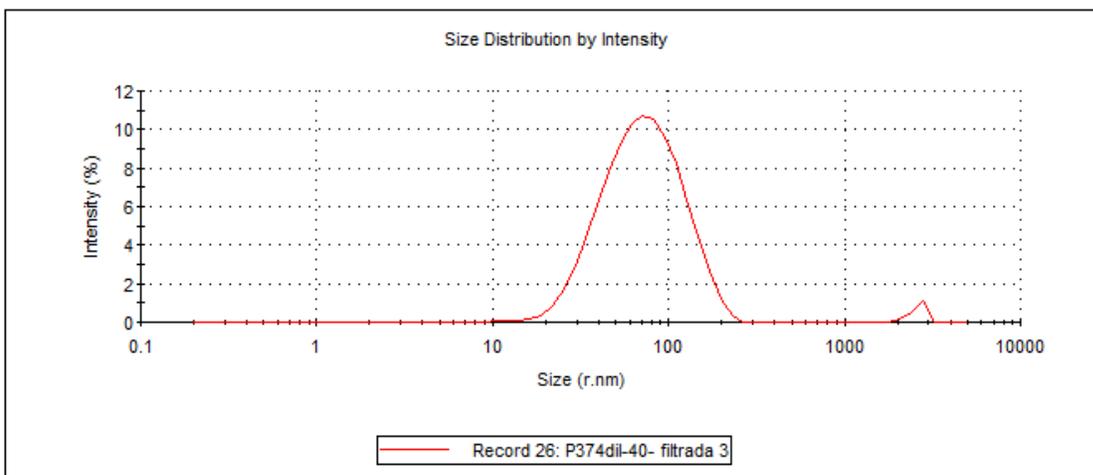


Figura 18: Distribuição das OMVs extraídas da cepa P374 por picos e tamanhos.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -16,9	Peak 1: -16,4	97,1	7,49
Zeta Deviation (mV): 8,14	Peak 2: -38,6	2,9	2,51
Conductivity (mS/cm): 0,143	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

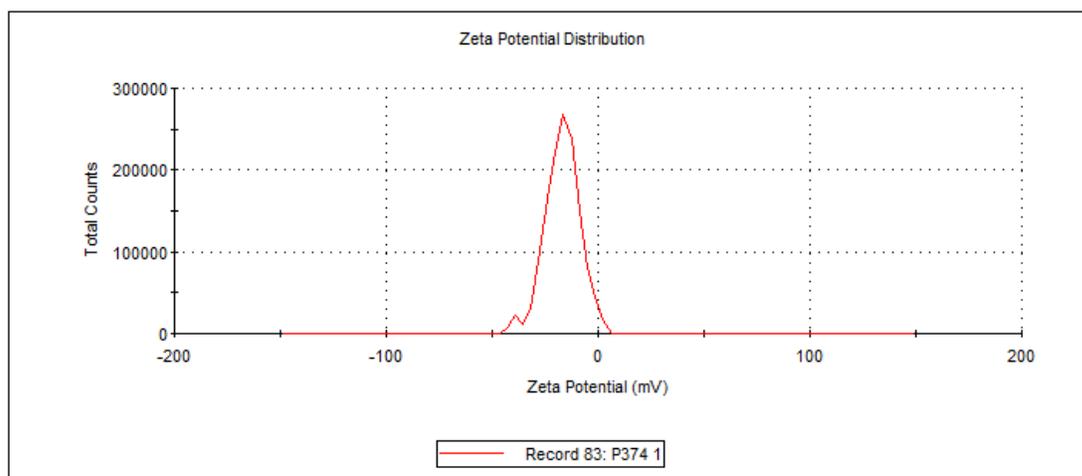


Figura 19: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa P374.

P2143

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 82,40	Peak 1: 57,53	87,8	22,20
Pdl: 0,210	Peak 2: 2617	7,2	226,8
Intercept: 0,279	Peak 3: 2,093	5,0	0,3361

Result quality : Refer to quality report

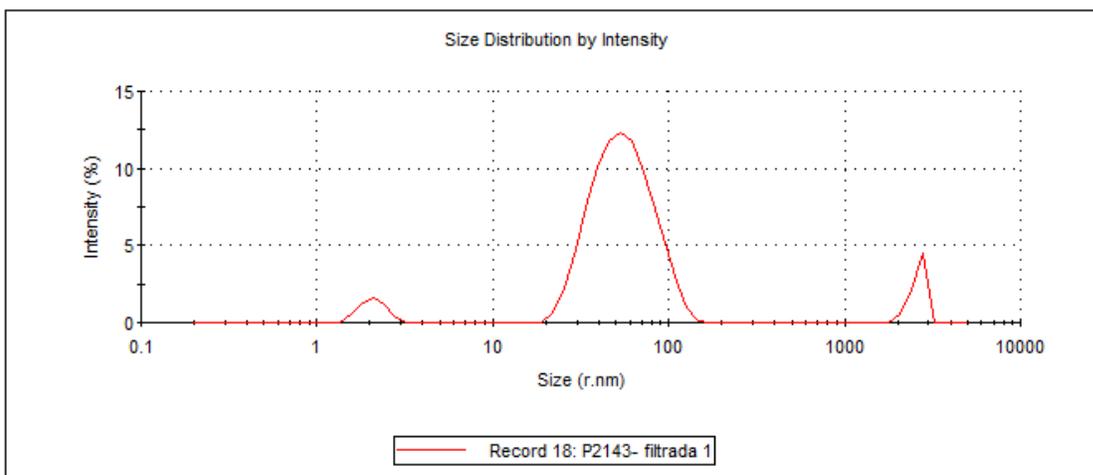


Figura 20: Distribuição das OMVs extraídas da cepa P2143 por picos e tamanhos.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -21,6	Peak 1: -21,6	100,0	5,92
Zeta Deviation (mV): 5,92	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,138	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

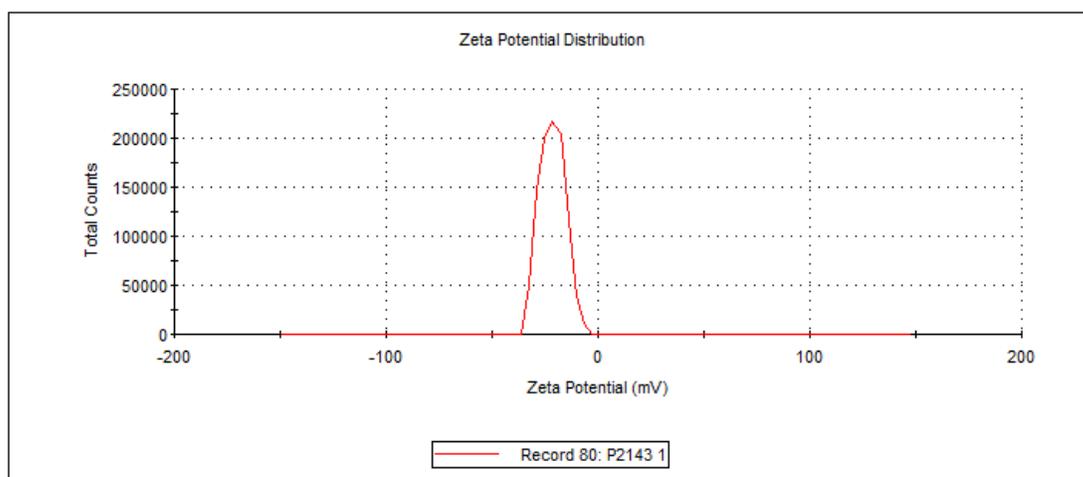


Figura 21: Distribuição do potencial zeta em (mV) da OMV da cepa P2143

Tabela 4: Linhagem de origem de cada OMV com seu respectivo tamanho médio (nm) e potencial zeta (mV).

Linhagem de origem da OMV	Tamanho médio (nm)	Potencial zeta (mV)
C2135	114,6	-19
P2143*	82,4	-21,6
P374*	78,46	-16,9
B4	84,9	-15,5
C2135 Δ pilE	71,76	-26
C2135 Δ synA	55,40	-27,9

Como foi proposto por MacDiarmid e colaboradores (Macdiarmid et al., 2009) todos tamanhos encontrados das nanoestruturas aqui estudadas são pequenas o suficiente para penetrar nas junções entre as células dos vasos que alimentam os tumores, que são de aproximadamente 400nm. Por sua vez Gorringer e colaboradores constataram em seus estudos de análise de tamanho das OMVs por zetasizer nano a ocorrência de picos maiores que 10 μ m, por exemplo nos casos que aparecem com asterisco na tabela 4, responsáveis pela agregação das nanopartículas que coincidentemente apresentam menor tamanho justamente quando sua carga superficial é mais negativa, postulando-se que quanto maior a carga da vesícula de membrana externa em módulo maior a repulsão entre elas dificultando a formação de aglomerados, possibilitando que o aparelho perceba o real tamanho das vesículas ao invés de grumos destas.

Tais dados corroboram com os encontrados para as linhagens C2135 e seus mutantes, onde a partícula com menor carga apresenta também o menor tamanho médio, isso pode ser explicado pelo mesmo motivo anteriormente citado onde o aumento das

forças de repulsão entre as mesmas impedindo a formação de aglomerados permitindo que estas sejam detectadas pelo aparelho com melhor acurácia.

A possível utilização das OMVs como carreadores de fármacos, RNAi ou até mesmo plasmídios só é possível com nanopartículas inócuas e que, por manter algumas das características da própria membrana celular bacteriana, apresentam, normalmente, taxa por células tumorais, todavia, quando isto não acontece ainda há a possibilidade de se trabalhar com a nanopartícula de forma a deixá-la mais seletiva ao tumor, por exemplo, utilizando anticorpos bidentados onde uma porção dele se ligará á partícula e outra a um receptor bastante exposto pelo tumor (Macdiarmid et al., 2009).

Além disso, somado com o tamanho e as cargas superficiais, metodologias podem ser desenvolvidas para a utilização de todas essas características de forma sinérgica visando uma otimização do processo de delivery de moléculas com atividade anti-tumoral.

Teste de Bradford

Pelos dados de absorvância da BSA (padrão) fez-se uma curva e desta tiramos uma equação relacionando absorvância com concentração de proteínas.

Aplicando-se a Equação 1, mostrada na legenda da Figura 22, onde C equivale a concentração proteica e A a absorvância, aos dados da Tabela 5, são obtidos os valores de concentração de proteína em cada amostra.

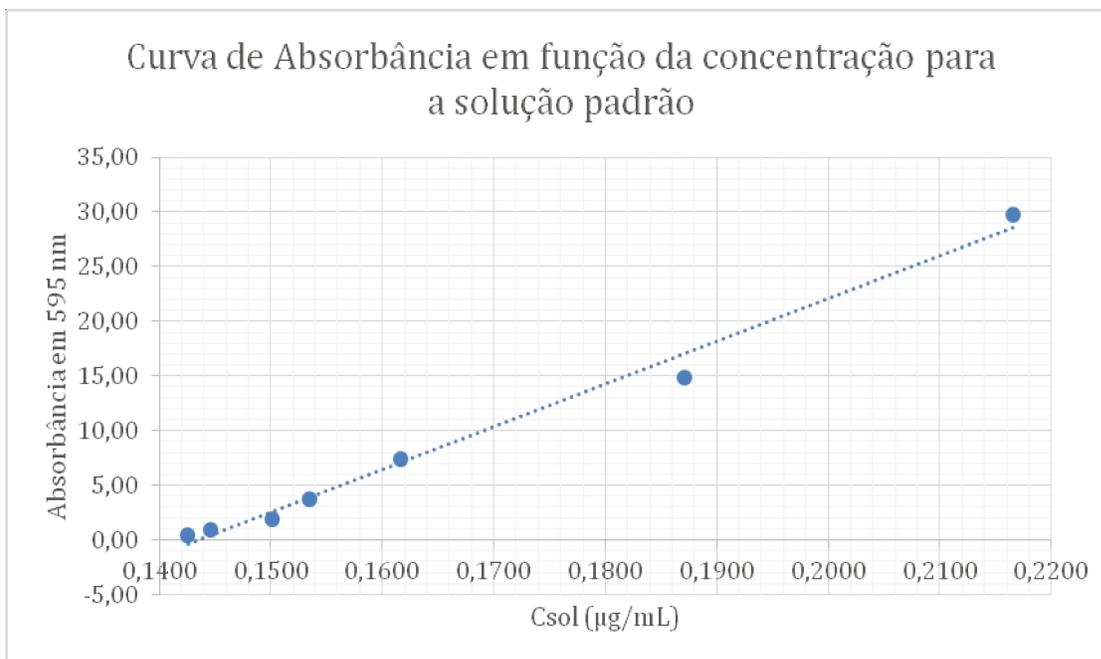


Figura 22: Curva construída com as concentrações e absorbâncias obtidas a partir da solução padrão. Aplicando-se o método dos mínimos quadrados aos dados, obtém-se a reta descrita pela Equação 1. ($C=390,47 \times A - 56,041$).

Tabela 5: concentração de proteína para OMVs originadas de diferentes linhagens

Identificação da OMV	Média da absorbância	Desvio Padrão	C_{sol} ($\mu\text{g/mL}$)
C2135	0,2074	0,0050	24,94
P374	0,3432	0,0469	77,97
B4	0,2116	0,0071	26,58
P2143	0,1621	0,0117	7,23
C2135 Δ synA	0,1478	0,0116	1,67
C2135 Δ pilE	0,1466	0,0046	1,21

A diferença na concentração proteica de cada extração mostra que neste processo a produção de vesículas de membrana externa é diferente pra cada cepa, além na diferença da produção, bactérias com genes mutados para proteínas da membrana externa tendem a produzir OMVs com diferentes razões lipídio/proteína, inferindo que,

neste caso, as produções destas nanopartículas não correspondem ao processo biogênico em bactérias normais (Kulp & Kuehn, 2008).

Teste morfológico

Nota-se nos dados mostrados na figura 23, que dentre as linhagens C2135 e seus mutantes a cepa C2135 $\Delta pilE$ apresentou menor porcentagem de células NG97 alteradas. Vale ressaltar que a pilina (proteína ausente nesta cepa) é a principal responsável pela aderência desta bactéria com as células epiteliais e endoteliais do hospedeiro e na sua ausência, cepa C2135 $\Delta pilE$, há a diminuição da capacidade da bactéria em causar danos na célula hospedeira o que deve ser explicado pela impossibilidade desta primeira interação descrita acima. (Virji *et al.*, 1993). Na figura 24 temos exemplos das alterações encontradas no teste: Alteração do tamanho e forma da célula acompanhada de condensação citoplasmática, aumento da vacuolização e presença de blebs (projeções da membrana com resquício de citoplasma).

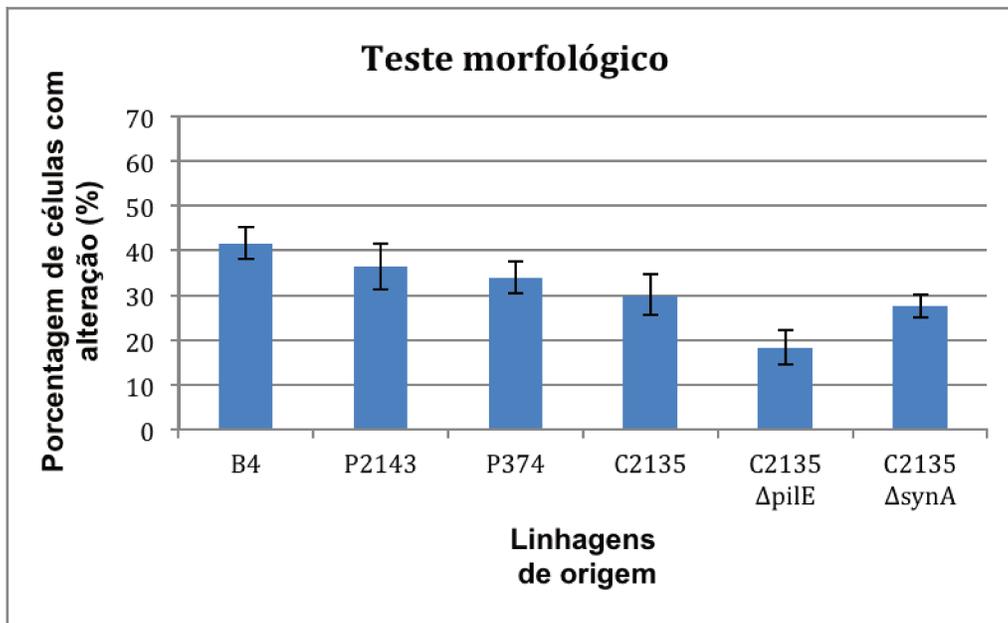


Figura 23: Porcentagem de células com alteração morfológica, sendo consideradas alterações aspectos como citoplasma mais denso, formação de expansões citoplasmáticas como vesículas (“blebs”), modificações quanto ao formato da própria célula e aumento da vacuolização

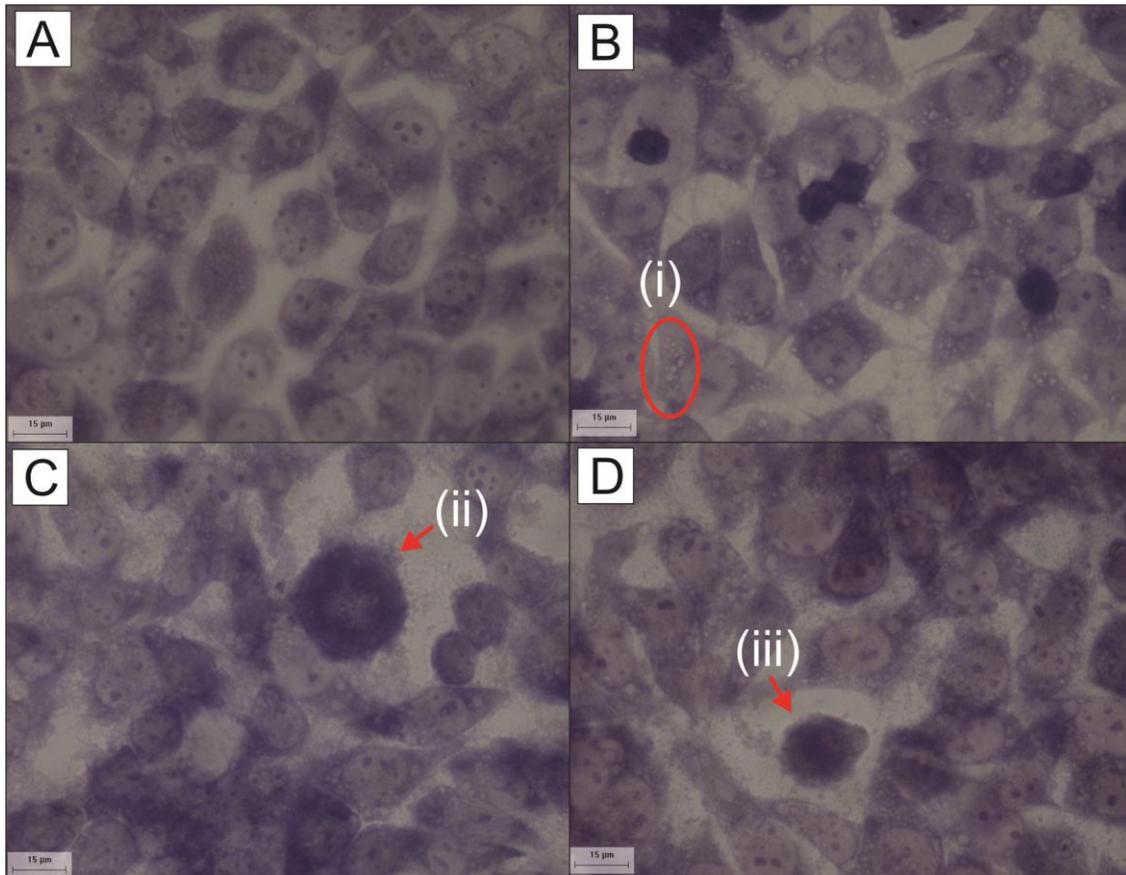


Figura 24: (A) células NG97 sem a presença de OMVs (Controle); (B) células NG97 com a presença de OMVs oriundos da linhagem B4, em destaque (i) o aumento da vacuolização celular; (C) células NG97 com a presença de OMVs oriundos da linhagem C2135 Δ pilE, em destaque a alteração do formato celular e a presença de blebs (ii); (D) células NG97 com a presença de OMVs oriundos da linhagem C2135 Δ synA, em destaque a condensação citoplasmática (iii).

Citotoxicidade em células NG97 pela incorporação do vermelho neutro.

Sobre a inocuidade das OMV verificou-se a citotoxicidade destas frente à células em cultivo celular. A figura 25 demonstra baixa ou nenhuma citotoxicidade das OMVs sobre a célula NG97. Para uma formulação ser considerada citotóxica faz necessário a diminuição em 75% ou menos das células viáveis pós administração da mesma sobre a cultura celular, neste caso, todas as OMVs apresentaram no máximo uma diminuição de

10% de células viáveis sendo todas as formulações neste estudo então consideradas não tóxicas.

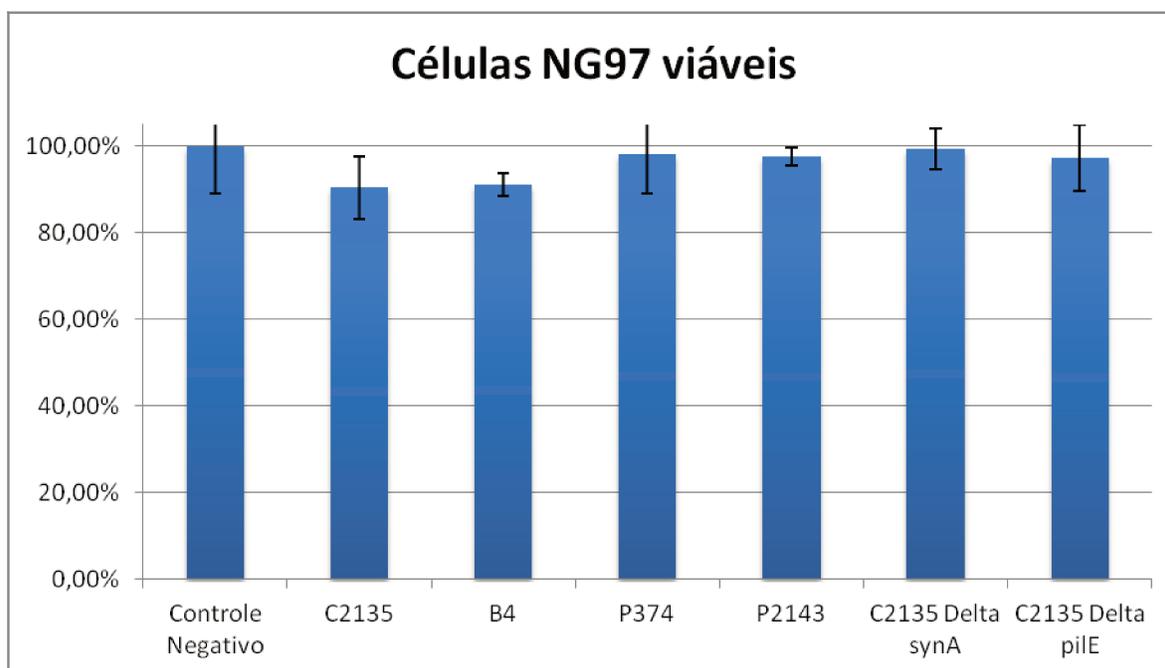


Figura 25: porcentagem de células viáveis pós aplicação das OMVs em células NG97.

A média das absorbâncias colhidas para controle negativo foram consideradas como 100% das células viáveis, e para cada OMV diferente foi feita a relação proporcional de células viáveis pela média das absorbâncias colhidas.

Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias por PCR em tempo real

A expressão das quimiocinas inflamatórias nas células da linhagem NG97 expostas às diferentes tipos de OMVs apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$ p/ o teste Student-Newman-Keuls) e estão sendo representadas nas figuras 26 e 27 na forma de média.

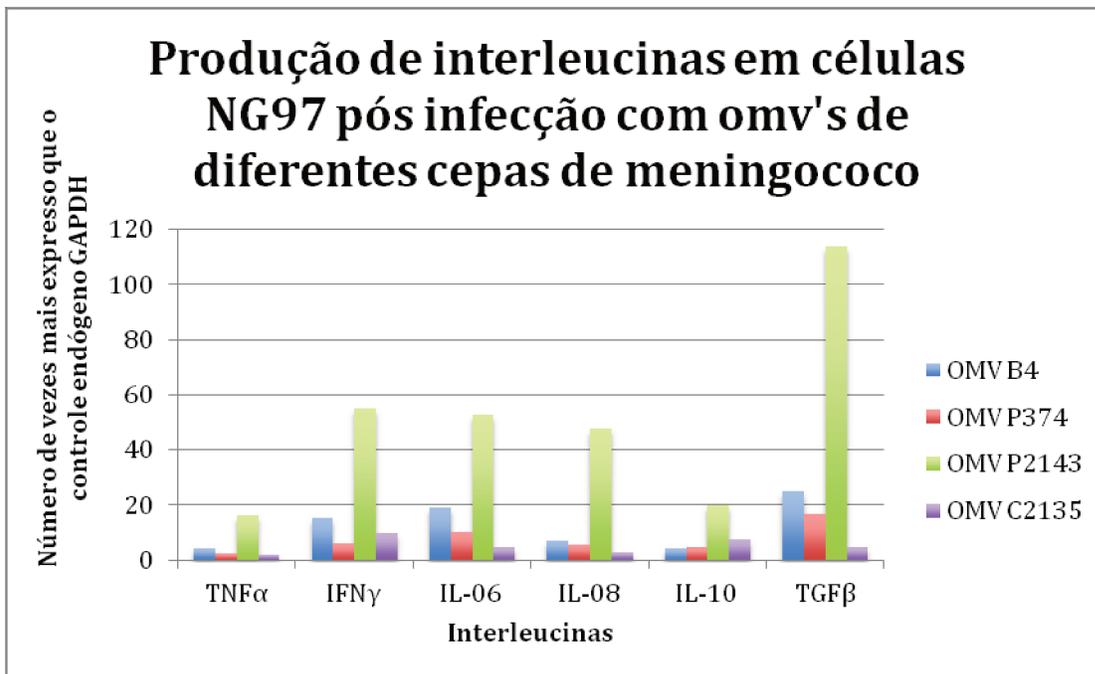


Figura 26: Diferença em expressão dos genes de citocinas inflamatórias quando comparados ao controle endógeno GAPDH nas células NG97 pós-interação com OMVs de diferentes linhagens de meningococo.

O processo de infecção por *N. meningitidis* é associado à expressão de determinadas citocinas inflamatórias, por exemplo, a expressão de TNF- α por infecções meningocócicas é bem fundamentada na literatura. Trata-se de uma molécula pró-inflamatória envolvida na regulação da resposta imune e na indução de morte celular via apoptose e inflamação. Sabe-se que o TNF- α é uma das mais importantes quimiocinas relacionadas ao choque séptico e sua liberação ocorre logo no começo deste processo fisiopatológico. A quimiocina IL-8 também é uma molécula pró-inflamatória envolvida na inflamação tecidual e sepsias. Trata-se de uma citocina que induz a quimiotaxia de células específicas, tais como neutrófilos (Tsiotou *et al.*, 2005).

A resposta inflamatória durante a meningite assim como a liberação de TNF- α , pode aumentar a permeabilidade da BHE (barreira hematoencefálica) (Schubert-Unkmeir *et al.*) causando danos à tipos celulares de origem neural, como a célula NG97 aqui

estudada que se trata de um glioblastoma, um câncer de origem astrocitário. Assim, também é possível relacionar a alta expressão de TNF- α em NG97 pós-infecção com OMVs neste tipo celular, sendo que segundo a Figura 26, a maior expressão desta interleucina quando comparado a expressão de GAPDH foi da cepa P2143, com aumento de 16 vezes, seguido pela cepa B4 que apresentou um aumento de 4x, depois P374 e C2135. Tal padrão é observado em todas citocinas pró inflamatórias, que são TNF α , IFN γ , IL-06 e IL-08 e não foi observado nas citocinas anti inflamatórias neurais, no caso a IL-10 e o TGF β . Conclui-se então que a indução da inflamação, neste caso, é independente da linhagem, já que tanto a responsável pela maior expressão quanto a menor expressão são cepas do sorogrupo C, e então a ativação da cascata inflamatória está relacionado a epítomos que podem estar presentes em uma bactéria do sorogrupo C e ausentes em outra que apresenta o mesmo polissacarídeo capsular (no caso do sorogrupo C é o α -2,9, ácido N-acetilneuramínico 1:1).

Em análise da figura 27, onde temos a comparação das OMVs produzidas pelas linhagens de *Neisseria meningitidis* C2135, e seus mutantes para pilina ($\Delta pilE$) e para cápsula ($\Delta synA$) temos alguns resultados interessantes. A bactéria mutante para pilina, proteína de membrana bacteriana, considerada um fator de virulência importante para o processo de aderência às células epiteliais, apresentou expressão menor que o controle endógeno (GAPDH) para todas as interleucinas, sendo exceção apenas o IFN γ . Em contrapartida, a cepa mutada para a cápsula (*synA*) apresentou grande quantidade de citocinas inflamatórias, quase tão pronunciada quanto sua cepa parental, a C2135.

A estrutura filamentosa proteica glicosilada da pilina, proteína sintetizada pelo gene *pilE*, é responsável pela adesão das células bacterianas às células epiteliais e endoteliais humanas. Estes apêndices atravessam a cápsula polissacarídica e se ligam a receptores nas células da nasofaringe (Kallstrom *et al.*, 1997, Pollard & Frasch, 2001). A presença desta proteína é necessária para a colonização e subsequente infecção do hospedeiro (Stephens *et al.*, 1983, Stephens & McGee, 1981, Stephens & McGee, 1983).

Somado com o fato de que no teste *in vitro*, não há a presença de células do sistema imune, sendo assim a cápsula, cuja sintetização está comprometida pelo nocaute do gene *synA*, responsável pelo escape da fagocitose *in vivo*, não é de muita valia para o processo inflamatório ao contrário da cepa que possui a pilina, proteína de membrana responsável pela interação entre as células do parasita e do hospedeiro que pode ser inativada por anticorpos, que neste caso, não estão presente no ensaio. Tais fatos corroboram com os dados encontrados onde a cepa mutada para cápsula apresenta pilina e, com esta, uma maior reação inflamatória pois sua interação com as células em cultura não está comprometida, ao contrário da cepa mutada para pilina, que teria uma maior capacidade de escape da fagocitose porém sua aderência às células epiteliais estaria comprometida.

Os resultados do teste de citotoxicidade e produção de citocinas inflamatórias parecem antagônicos onde o primeiro demonstra nenhuma citotoxicidade da nanopartícula sobre a célula NG97 enquanto o segundo mostra que este causa ativação da inflamação demonstrando o stress celular causado pela partícula, contudo eles corroboram uma vez que a célula está sinalizando seu stress devido à presença das OMVs porém é necessário o aparato do sistema imunológico para que essa sinalização seja interpretada e culmine no ataque ao responsável pelo distúrbio celular.

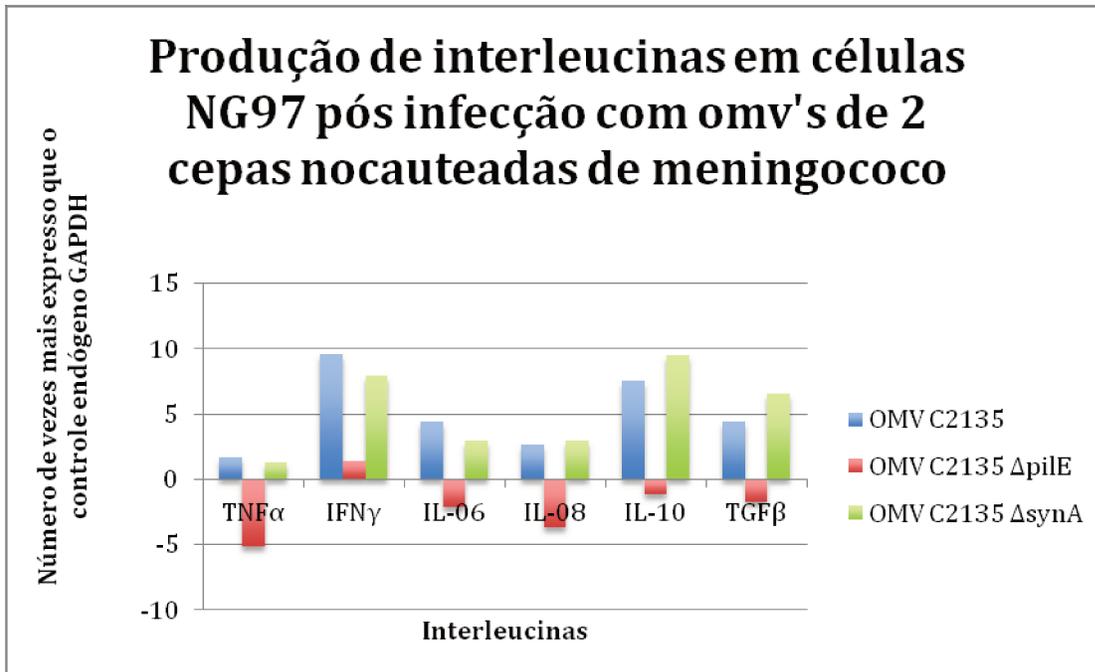


Figura 27: Diferença em expressão dos genes de interleucinas quando comparados ao controle endógeno GAPDH nas células NG97 pós interação com OMVs linhagens mutadas de meningococo.

A resposta imune celular *in vivo* em resposta à doença meningocócica é bem complexa e interessante, visto que pouco se sabe sobre a função de mecanismos de ativação das células T CD4- e CD8-, mas sabe-se por exemplo que em estudos em pacientes com meningite meningocócica relataram um percentual elevado de células CD4 com receptores do tipo $\gamma\delta$ (CD4 $\gamma\delta$), estas quando estimuladas com concanavalina A produziram níveis elevados de citotoxinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6). Tal elevação foi também observada na presença apenas das OMVs extraídas de *N. meningitidis* (Raziuddin *et al.*, 1994).

Tem-se neste estudo uma boa ideia na diferença de produção de interleucinas inflamatórias pelas células da glia frente à estimulação meningocócica, mas vale ressaltar que diferentes tipos celulares respondem diferentemente a estímulos do mesmo patógeno (Carneiro & Alves, 2011).

Sabe-se também que as proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* como a pilina e sua cápsula são altamente mitogênicas para linfócitos B, em indivíduos normais não estimulam os linfócitos T. Estes estimulam linfócitos B que estão envolvidos na co-estimulação de linfócitos T por meio dos ligantes CTLA-4 e CD28. Uma vez estimulados, os linfócitos T produzem IL-2 e IL-4 que, por fim, irão estimular os linfócitos B à produção de anti corpos (Wetzler *et al.*, 1996).

O reconhecimento das proteínas da membrana externa de *N. meningitidis* por linfócitos T é restrito às moléculas de MHC do tipo II, além disso, diversos autores demonstraram que os epítomos mais imunogênicos estão localizados principalmente na região transmembrânica destas proteínas, sendo, portanto, altamente conservados no gênero *Neisseria* (Wiertz *et al.*, 1992, Wiertz *et al.*, 1991). Tais fatos corroboram com o encontrado neste trabalho, já que as vesículas de membrana externa mantém grande parte da estrutura transmembrânica da bactéria, assim como seu conteúdo proteico, e como neste há a presença dos principais epítomos imunogênicos para esta bactéria, pode-se observar uma quantidade considerável de citocinas inflamatórias na presença apenas da OMV.

A interação entre várias linhagens de bactérias induzindo o processo de apoptose em alguns tipos de células tumorais em cultura demonstrou uma eficiência dos patógenos em seu uso como terapia antitumoral (Carneiro & Alves, 2011). No entanto, apresenta-se neste trabalho a hipótese de que apenas as OMVs de algumas linhagens de *N. meningitidis* são capazes de produzir grande quantidade de RNAm para o fator de necrose tumoral (TNF- α) em células NG97, o papel deste já é bem fundamentada na literatura. Trata-se de uma molécula pró-inflamatória, envolvida na regulação da resposta imune e na indução de morte celular via apoptose e inflamação (Tsiotou & Sakorafas, 2004).

São necessários mais estudos a fim de verificar se toda a cascata apoptótica está ativa no processo de infecção deste tipo de célula por meningococos já que o TNF- α não

está envolvido só neste processo fisiológico. Porém, não seria surpresa no caso das OMVs serem consideradas endotoxinas que, além de servir como um meio de comunicação entre a célula bacteriana e o ambiente, sem que este gaste energia se movimentando, é também um método apropriado para liberação de substâncias protegidas e concentradas pelo microrganismo. Existem evidências de que a sepsias pode ser provocada pela grande concentração de LPS nas vesículas de membrana externa destas bactérias, que são dispersas na corrente sanguínea do indivíduo doente, responsável pela ativação de toda a cascata de inflamação de forma sistêmica (Kulp & Kuehn, 2008).

Para a utilização de nanopartículas como fim terapêutico deste tipo de câncer suspeita-se que quanto mais inócua a vesícula maior a possibilidade desta chegar ao seu alvo, visto que, o sistema carreador ao atingir a corrente sanguínea poderia ativar os mediadores da inflamação, atraindo células de combate imunológico para as redondezas que, por fim, poderiam desestruturar tais carreadores que devem manter sua conformação inicial até atingirem as células tumorais, caso contrário sua atuação pode se comprometer assim como a biodisponibilidade do medicamento nela presente. Mais estudos são necessários para comprovar tal possibilidade, tendo em vista que há uma grande distância entre a análise de uma substância *in vitro* e sua interação num sistema tão complexo e bem estruturado como o caso do corpo humano.

CONCLUSÕES

Conforme tudo o que fora apresentado até o presente momento podemos concluir que:

- A produção de vesículas de membrana externa em *Neisseria meningitidis* à partir de ultrafiltração produziu OMVs de tamanhos e cargas menores que 200nm, tornando este um processo viável, menos trabalhosa e mais rápida que os métodos descritos na literatura;
- A concentração proteica das OMVs do meningococo varia conforme a linhagem que as originaram, além disso, o “Knock-out” gênico para os genes *synA* e *pilE*, responsáveis pela produção da cápsula e da pilina, também alteram tais quantidades proteicas;
- As alterações morfológicas causadas em células NG97 variam de acordo com a linhagem de origem das OMVs, além disso, nas mesma linhagem onde a expressão de alguns genes como *synA* e *pilE* é interrompida, tal tendência também é observada;
- A produção de citocinas inflamatórias ocorre quando as células NG97 são submetidas ao contato das OMVs;
- O uso de OMVs para a redução de astrocitomas demonstra-se ser promissora para o uso no tratamento desse tipo de tumor sólido como possível veículo para moléculas de combate deste tipo de câncer. Dentre todas as nanopartículas analisadas, a mais promissora para o uso como possível carreador de moléculas mais específico para astrocitomas é a proveniente da cepa C2135 $\Delta pilE$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman, M., (2004) Population structure of pathogenic bacteria revisited. *Int J Med Microbiol* **294**: 67-73.
- Baehr, W., E. C. Gotschlich & P. J. Hitchcock, (1989) The virulence-associated gonococcal H.8 gene encodes 14 tandemly repeated pentapeptides. *Mol Microbiol* **3**: 49-55.
- Bakir, M., A. Yagci, N. Ulger, C. Akbenlioglu, A. Ilki & G. Soyletir, (2001) Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in relation to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* colonization in healthy children: apropos of 1400 children sampled. *Eur J Epidemiol* **17**: 1015-1018.
- Bart, A., C. Barnabe, M. Achtman, J. Dankert, A. van der Ende & M. Tibayrenc, (2001) The population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A fits the predictions for clonality. *Infect Genet Evol* **1**: 117-122.
- Bash, M. C., K. B. Lesiak, S. D. Banks & C. E. Frasch, (1995) Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques. *Infect Immun* **63**: 1484-1490.
- Bennett, D. E., R. M. Mulhall & M. T. Cafferkey, (2004) PCR-based assay for detection of *Neisseria meningitidis* capsular serogroups 29E, X, and Z. *J Clin Microbiol* **42**: 1764-1765.
- Berlanda Scorza, F., F. Doro, M. J. Rodriguez-Ortega, M. Stella, S. Liberatori, A. R. Taddei, L. Serino, D. Gomes Moriel, B. Nesta, M. R. Fontana, A. Spagnuolo, M. Pizza, N. Norais & G. Grandi, (2008) Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 mutant. *Mol Cell Proteomics* **7**: 473-485.
- Borenfreund, E. & C. Shopsis, (1985) Toxicity monitored with a correlated set of cell-culture assays. *Xenobiotica* **15**: 705-711.
- Bos, M. P., V. Robert & J. Tommassen, (2007) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**: 191-214.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandtzaeg, P., (1995) The role of humoral mucosal immunity in the induction and maintenance of chronic airway infections. *Am J Respir Crit Care Med* **151**: 2081-2086; discussion 2086-2087.
- Carneiro, R. F. P. & D. A. Alves, (2011) Effects of *Neisseria meningitidis* infection in Tumor Glioblastoma Cell Line NG97: Respiratory Pathogen Inducing Apoptosis. *Bacteriology & Parasitology*.
- Caugant, D. A., K. Bovre, P. Gaustad, K. Bryn, E. Holten, E. A. Hoiby & L. O. Froholm, (1986) Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol* **132**: 641-652.
- Caugant, D. A., E. A. Hoiby, P. Magnus, O. Scheel, T. Hoel, G. Bjune, E. Wedege, J. Eng & L. O. Froholm, (1994) Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* **32**: 323-330.
- Chanteau, S., A. M. Rose, S. Djibo, F. Nato & P. Boisier, (2007) Biological diagnosis of meningococcal meningitis in the African meningitis belt: current epidemic strategy and new perspectives. *Vaccine* **25 Suppl 1**: A30-36.
- Ciofu, O., T. J. Beveridge, J. Kadurugamuwa, J. Walther-Rasmussen & N. Hoiby, (2000) Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **45**: 9-13.
- Collins, R. F., K. Beis, C. Dong, C. H. Botting, C. McDonnell, R. C. Ford, B. R. Clarke, C. Whitfield & J. H. Naismith, (2007) The 3D structure of a periplasm-spanning platform required for

- assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2390-2395.
- Connell, H. C., (1935) The Study and Treatment of Cancer by Proteolytic Enzymes: Preliminary Report. *Can Med Assoc J* **33**: 364-370.
- de Vries, F. P., A. van Der Ende, J. P. van Putten & J. Dankert, (1996) Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun* **64**: 2998-3006.
- DeVoe, I. W., (1982) The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiol Rev* **46**: 162-190.
- Ellison, D. W., (1998) Non-astrocytic gliomas in Neuropathology. *London: Mosby Chapter 36*.
- Etienne, J., G. Sperber, A. Adamou & J. J. Picq, (1990) [Epidemiological notes: meningococcal meningitis of serogroup X in Niamey (Niger)]. *Med Trop (Mars)* **50**: 227-229.
- Frosch, M., U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse & C. Weisgerber, (1991) Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol* **5**: 1251-1263.
- Furuta, N., H. Takeuchi & A. Amano, (2009) Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect Immun* **77**: 4761-4770.
- Grenier, D. & D. Mayrand, (1987) Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* **55**: 111-117.
- Grippo, M. C., P. F. Penteado, E. F. Carelli, M. A. Cruz-Hofling & L. Verinaud, (2001) Establishment and partial characterization of a continuous human malignant glioma cell line: NG97. *Cell Mol Neurobiol* **21**: 421-428.
- Harrison, L. H., K. A. Jolley, K. A. Shutt, J. W. Marsh, M. O'Leary, L. T. Sanza & M. C. Maiden, (2006) Antigenic shift and increased incidence of meningococcal disease. *J Infect Dis* **193**: 1266-1274.
- Hitchcock, P. J., L. Leive, P. H. Makela, E. T. Rietschel, W. Strittmatter & D. C. Morrison, (1986) Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol* **166**: 699-705.
- Hollanda, L. M., G. C. Cury, R. F. Pereira, G. A. Ferreira, A. Sousa, E. M. Sousa & M. Lancellotti, Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnology* **9**: 28.
- Hussey, G., H. Schaaf, D. Hanslo, J. Hitchcock, G. Coetzee, J. Pitout, H. Malan & P. Donald, (1997) Epidemiology of post-neonatal bacterial meningitis in Cape Town children. *S Afr Med J* **87**: 51-56.
- Inagaki, S., S. Onishi, H. K. Kuramitsu & A. Sharma, (2006) *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". *Infect Immun* **74**: 5023-5028.
- Iversson, L. B., (1976) [Epidemiological aspects of meningococcal meningitis in the city of Sao Paulo (Brazil) during 1968-1974]. *Rev Saude Publica* **10**: 1-16.
- Kadurugamuwa, J. L. & T. J. Beveridge, (1996) Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* **178**: 2767-2774.
- Kallstrom, H., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson & A. B. Jonsson, (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**: 639-647.
- Kleihues, P. & W. K. Cavenee, (1999) Pathology and genetics of tumours of the nervous system. 2000 pp. 314 pp. In., pp.
- Koch, A. L., (1998) The biophysics of the gram-negative periplasmic space. *Crit Rev Microbiol* **24**: 23-59.

- Kolling, G. L. & K. R. Matthews, (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1843-1848.
- Kulp, A. & M. J. Kuehn, Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**: 163-184.
- Lancellotti, M., A. Guiyoule, C. Ruckly, E. Hong, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2006) Conserved virulence of C to B capsule switched *Neisseria meningitidis* clinical isolates belonging to ET-37/ST-11 clonal complex. *Microbes Infect* **8**: 191-196.
- Macdiarmid, J. A., N. B. Amaro-Mugridge, J. Madrid-Weiss, I. Sedliarou, S. Wetzel, K. Kochar, V. N. Brahmabhatt, L. Phillips, S. T. Pattison, C. Petti, B. Stillman, R. M. Graham & H. Brahmabhatt, (2009) Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nature Biotechnology* **27**: 643-651.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman & B. G. Spratt, (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-3145.
- Mashburn, L. M. & M. Whiteley, (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**: 422-425.
- Mattos, I. B., D. A. Alves, L. M. Hollanda, H. J. Ceragiogli, V. Baranauskas & M. Lancellotti, Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process. *J Nanobiotechnology* **9**: 53.
- Mayrand, D. & D. Grenier, (1989) Biological activities of outer membrane vesicles. *Can J Microbiol* **35**: 607-613.
- McBroom, A. J. & M. J. Kuehn, (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* **63**: 545-558.
- Nassif, X., (2000) Gonococcal lipooligosaccharide: an adhesin for bacterial dissemination? *Trends Microbiol* **8**: 539-540.
- Pollard, A. J. & C. Frasch, (2001) Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* **19**: 1327-1346.
- Raziuddin, S., N. A. Mir, M. e.-H. el-Awad, A. W. Telmesani & M. al-Janadi, (1994) Gamma delta T lymphocytes and proinflammatory cytokines in bacterial meningitis. *J Allergy Clin Immunol* **93**: 793-798.
- Renelli, M., V. Matias, R. Y. Lo & T. J. Beveridge, (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* **150**: 2161-2169.
- Safadi, M. A. & A. P. Barros, (2006) Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. *J Pediatr (Rio J)* **82**: S35-44.
- Sambrook, J. & M. J. Gething, (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**: 224-225.
- Schoen, C., J. Weber-Lehmann, J. Blom, B. Joseph, A. Goesmann, A. Strittmatter & M. Frosch, Whole-genome sequence of the transformable *Neisseria meningitidis* serogroup A strain WUE2594. *J Bacteriol* **193**: 2064-2065.
- Schooling, S. R. & T. J. Beveridge, (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**: 5945-5957.
- Schubert-Unkmeir, A., C. Konrad, H. Slanina, F. Czapek, S. Hebling & M. Frosch, *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog* **6**: e1000874.
- Shintani, Y., Y. Sawada, T. Inagaki, Y. Kohjimoto, Y. Uekado & T. Shinka, (2007) Intravesical instillation therapy with bacillus Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: study of the mechanism of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Int J Urol* **14**: 140-146.

- Stephens, D. S., L. H. Hoffman & Z. A. McGee, (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* **148**: 369-376.
- Stephens, D. S. & Z. A. McGee, (1981) Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* **143**: 525-532.
- Stephens, D. S. & Z. A. McGee, (1983) Association of virulence of *Neisseria meningitidis* with transparent colony type and low-molecular-weight outer membrane proteins. *J Infect Dis* **147**: 282-292.
- Stock, J. B., B. Rauch & S. Roseman, (1977) Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **252**: 7850-7861.
- Swartley, J. S., A. A. Marfin, S. Edupuganti, L. J. Liu, P. Cieslak, B. Perkins, J. D. Wenger & D. S. Stephens, (1997) Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 271-276.
- Taha, M. K., A. E. Deghmane, A. Antignac, M. L. Zarantonelli, M. Larribe & J. M. Alonso, (2002) The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol* **10**: 376-382.
- Taha, M. K., P. C. Morand, Y. Pereira, E. Eugene, D. Giorgini, M. Larribe & X. Nassif, (1998) Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol* **28**: 1153-1163.
- Thompson, S. S., Y. M. Naidu & J. J. Pestka, (1985) Ultrastructural localization of an extracellular protease in *Pseudomonas fragi* by using the peroxidase-antiperoxidase reaction. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1038-1042.
- Tsiotou, A. G. & G. H. Sakorafas, (2004) Management of septic shock: current concepts, with a particular emphasis on the role of source control, and future perspectives. *Eur J Anaesthesiol* **21**: 337-360.
- Tsiotou, A. G., G. H. Sakorafas, G. Anagnostopoulos & J. Bramis, (2005) Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* **11**: RA76-85.
- Tzeng, Y. L. & D. S. Stephens, (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect* **2**: 687-700.
- Varela, J. N., M. S. J. Izidoro, L. M. Hollanda & M. Lancellotti, (2012) Membrane Protein as Novel Targets for Vaccine Production in *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *Vaccines & Vaccination*.
- Virji, M., J. R. Saunders, G. Sims, K. Makepeace, D. Maskell & D. J. Ferguson, (1993) Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol Microbiol* **10**: 1013-1028.
- Wei, M. Q., A. Mengesha, D. Good & J. Anne, (2008) Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Lett* **259**: 16-27.
- Wei, Z., R. Li, A. Zhang, H. He, Y. Hua, J. Xia, X. Cai, H. Chen & M. Jin, (2009) Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet Microbiol* **137**: 196-201.
- Wetzler, L. M., Y. Ho & H. Reiser, (1996) Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* **183**: 1151-1159.
- Wiertz, E. J., J. A. van Gaans-van den Brink, H. Gausepohl, A. Prochnicka-Chalufour, P. Hoogerhout & J. T. Poolman, (1992) Identification of T cell epitopes occurring in a meningococcal class 1 outer membrane protein using overlapping peptides assembled with simultaneous multiple peptide synthesis. *J Exp Med* **176**: 79-88.
- Wiertz, E. J., J. A. van Gaans-van den Brink, G. M. Schreuder, A. A. Termijtelen, P. Hoogerhout & J. T. Poolman, (1991) T cell recognition of *Neisseria meningitidis* class 1 outer membrane

- proteins. Identification of T cell epitopes with selected synthetic peptides and determination of HLA restriction elements. *J Immunol* **147**: 2012-2018.
- Wong, V. K., W. Hitchcock & W. H. Mason, (1989) Meningococcal infections in children: a review of 100 cases. *Pediatr Infect Dis J* **8**: 224-227.
- Yaron, S., G. L. Kolling, L. Simon & K. R. Matthews, (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from Escherichia coli O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4414-4420.
- Zarantonelli, M. L., A. Antignac, M. Lancellotti, A. Guiyoule, J. M. Alonso & M. K. Taha, (2006) Immunogenicity of meningococcal PBP2 during natural infection and protective activity of anti-PBP2 antibodies against meningococcal bacteraemia in mice. *J Antimicrob Chemother* **57**: 924-930.