

IVES BERNARDELLI DE MATTOS

**“ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO
COMO ADJUVANTE EM VACINAS DE MEMBRANA
EXTERNA DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*”**

***“ANALYSIS OF THE USE OF CARBON NANOTUBES AS
ADJUVANT IN OUTER MEMBRANE VACCINES FROM
NEISSERIA MENINGITIDIS”***

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

IVES BERNARDELLI DE MATTOS

**“ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO COMO ADJUVANTE
EM VACINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*”**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

**“ANALYSIS OF THE USE OF CARBON NANOTUBES AS ADJUVANT IN OUTER
MEMBRANE VACCINES FROM *NEISSERIA MENINGITIDIS*”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Master's thesis presented to the Functional and Molecular Biology Postgraduation Programme of the Institute of Biology of the University of Campinas to obtain the Master's degree in Functional and Molecular Biology in Biochemistry.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO IVES BERNARDELLI DE MATTOS
E ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCELO LANCELOTTI

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2012

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

M436e

Mattos, Ives Bernardelli de, 1985-

Estudo da utilização de nanotubos de carbono como adjuvante em vacinas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* / Ives Bernardelli de Mattos. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcelo Lancellotti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Nanotubos de carbono.
3. Vesícula da membrana externa. 4. Adjuvantes imunológicos. I. Lancellotti, Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of the use of carbon nanotubes as adjuvant in outer membrane vaccines from *Neisseria meningitidis*

Palavras-chave em Inglês:

Neisseria meningitidis

Carbon nanotubes

Outer membrane vesicle

Immunologic adjuvants

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Lancellotti [Orientador]

Maria Alvina Krähenbühl

Cleyton Crepadi Domingues

Data da defesa: 25-07-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (Orientador)



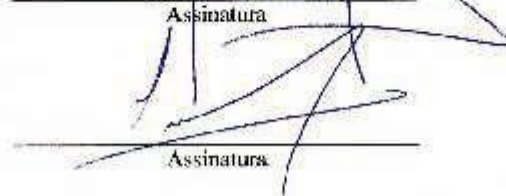
Assinatura

Profa. Dra. Maria Alvina Krähenbühl



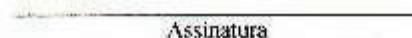
Assinatura

Prof. Dr. Cleyton Crepladi Domingues



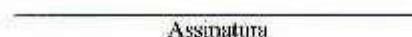
Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino



Assinatura

Profa. Dra. Cintia Maria Saia Cereda



Assinatura

***“O tempo e a paciência
são dois eternos beligerantes”***

Léon Tolstói

Somente conquistei isso graças à minha Família, seja ela de sangue ou não, e é pra vocês que eu dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Profº Dr. Marcelo Lancellotti, professor que acreditou no meu trabalho, me apoiou o tempo todo, independente de qual situação era essa, me orientou no dia-a-dia do laboratório, no dia-a-dia da minha vida, soube me puxar quando devia, soube quando me deixar levar quando precisava, me puxou a orelha, me ouviu, me cobrou para que eu diminuísse excesso de exigências que eu tenho comigo mesmo, enfim foi um orientador no sentido completo da palavra. Agradeço pela amizade e pela confiança que foi posta a prova inúmeras vezes. Espero ter correspondido com as suas expectativas.

Ao Profº Dr. Cleyton Crepaldi Domingues pela atenção, disposição, seriedade, dedicação e por me ajudar a fazer esse trabalho o melhor possível.

A Profª Dra. Maria Alvina Krähenbühl por poder me dar a honra de tê-la nesse momento tão importante em minha carreira. Por me receber tão bem a todos os lugares em que nos encontramos, pela hospitalidade que sempre tive em sua casa.

A Profª Dra. Cíntia Cereda, e ao Profº Dr. Rodrigo Catharino por aceitarem fazer parte da minha banca de mestrado.

A minha família que me conduziu até aqui me apoiando não importando as decisões, que mesmo quando meu caminhar era lento, quase um rastejo, se colocaram a marchar ao meu lado para me incentivar a apertar o passo e não desistir do meu destino.

Foi no curso desse trabalho que me despedi de um dos humanos mais incríveis que pude conhecer. Engraçado imaginar como a vida se torna diferente quando não encontramos mais nela alguém que esteve lá desde o início. Não sabia o que era o mundo sem ele, mas foi com ele que eu aprendi a conhecer o mundo. Ele que me mostrou quem eu queria ser. Um modelo com quem

tive o prazer de dividir esses últimos 27 anos. Sou muito grato por poder ter vivido tão próximo a uma pessoa como o meu avô. Muito obrigado Seo Luiz Bernardelli!

Devo muito a uma pessoa em especial, que me encorajou a tomar certas decisões que antes dela nem sonhava, que me ensinou a abrir o meu coração completamente, me ensinou que ainda podia confiar cegamente em alguém. Apareceu-me como por um acaso, e nesses acasos da vida foi me invadindo, me dominando. Hoje não consigo mais pensar em mim antes de pensar em dois. Foi ela quem me ensinou que amor rima tanto com dedicação, e é com essa dedicação que eu resolvi seguir com tudo o que terei pela frente. Não temo o amanhã por causa dela. Obrigado Larissa Sayuri Kato.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado. Aquele que esteve ao meu lado por muitas e muitas mesas de bar, falando da vida e divagando sobre as coisas mais importantes que a gente nem mesmo se dá conta. Aquele que sempre me mostrou que o mais importante nessa vida é rir de tudo e quando se passar por algum problema é só esperar, pois logo isso será mais um motivo de piadas. Aquele que esteve sempre disposto a me encontrar pra conversar, não importando o lugar ou o horário. Aquele que mesmo cheio de coisas a fazer sempre encontrava um momento pra ouvir ou ser ouvido. No fim, com essas definições, acabei por perceber que todos eles se encaixam nelas, e todos são igualmente companheiros.

Gostaria de agradecer a minha querida amiga Profª Dra. Maricene Sabha. Exemplo de pessoa. Decidida. Trabalhadora. Dedicada com todo mundo como se todos fossem iguais. Adjetivos faltam para mostrar as qualidades que um ser como ela possui. Obrigado pelas palavras, pelo companheirismo, pelo cuidado que você tem conosco. Nossa madrinha de todas as horas. Espero poder corresponder algum dia com um pouquinho do que você é para mim.

A minha cunhada Maria Cecília Krähenbühl Amstalden, que é parte da família, mas se eu não dedico um espaço a parte coloco em risco a chance de ver meus genes seguindo adiante. Você, antes de mais nada, foi a amiga que me ajudou a fazer com que os problemas do dia-a-dia se tornassem cada vez menos importantes. Júbilo ao saber que terei na minha família tal exemplar e agradeço por, assim, poder ter bastante tempo pra retribuir tudo o que você me ofereceu nos dias de tormenta. É um prazer poder dividir algo que é tão importante pra mim com você.

Ao Danilo Antonini Alves, meu caro amigo. Recebeu-me como se eu fosse da sua família. Não me esqueço do dia em que cheguei a Campinas. Devo muito a você pelo meu início ser tão mais fácil. Devo muito a você por todo o carinho que recebi, pelo companheirismo. É um cara muito bom acima de qualquer coisa.

A Alice Tavares Reis, que me suportou tantas e tantas vezes, que me ajudou a decifrar as minhas patologias bizarras dando diversas consultas grátis. Apoiou-me em diversos momentos que às vezes nem eu mesmo sabia se devia me apoiar ou não. Obrigado por tudo, querida amiga.

A Prof^a Dra. Luciana Maria Hollanda por me encorajar sempre e por todas as palavras de carinho e toda a atenção que me dedicou. Pelos ensinamentos, pelas risadas, pela loucura, pela lucidez.

Gostaria agradecer a todos me ajudaram, direta ou indiretamente, que permitiram que esse trabalho pudesse ser realizado: a Adriane Cristina Sprogis, a Stella Ferraz, ao André Renno, a Gisele Gentili Cury, a Giane Carneiro, ao Davi de Santi, ao Pedro Longo, ao Ancelmo Rabelo de Souza, ao Rodolfo Boer Bonafini, a Camila Bortoletto, ao eterno muso Renan Koseki, a Cibele Zanardi Esteves, a Flávia Luna Lima, a Juliana Mattoso, a Prof^a Dra. Wanda Almeida, a Rafa Jorge Trad e a tantas outras pessoas que acabaram sendo esquecidas por essa já falha memória.

Talvez não haja espaço aqui, nessas poucas linhas, para agradecer de maneira completa aos que fizeram essa minha etapa ser tão magnífica e enriquecedora. Talvez não haja agradecimentos possíveis para expressar a importância disso para mim. Deixa assim então. Que novos caminhos se abram e que esses sejam amplos o suficiente para permitir que todos caminhem para o mesmo lugar...

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	14
INTRODUÇÃO	15
<i>Neisseria meningitidis</i>	15
Histórico de vacinas de meningococo	16
Vesícula da membrana externa (<i>Outer Membrane Vesicles</i> - OMV)	18
Novo processo de produção de OMVs	20
Adjuvantes	21
Nanobiotecnologia	22
Nanoestruturas de carbono	22
OBJETIVOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
Produção das vesículas de membrana externa	25
Caracterização das nanopartículas bacterianas	26
Nanoestruturas de carbono	27
Preparação das vacinas de OMV	29
Experimentação animal	30
Hepatotoxicidade das nanopartículas	31
<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	31
Análise estatística	33
RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
Cinética da produção de OMVs	34
Microscopia eletrônica das vesículas	36
Hepatotoxicidade das nanopartículas	38
Análises da Resposta Imune dos Camundongos Vacinados	39
Análise da Resposta Imune Utilizando Vacinas de OMVs Provenientes da Linhagem C2135	39
Análise da Resposta Imune Utilizando Vacinas de OMVs Provenientes da Linhagem IAL 2443	49
Análise da Resposta Imune Utilizando Vacinas de OMVs Provenientes da Linhagem B4	59
CONCLUSÕES	68
DESAFIOS FUTUROS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS	80

RESUMO

As doenças bacterianas exigem grande preocupação por parte das autoridades sanitárias. As causadas pela bactéria *Neisseria meningitidis*, como a meningocócica e a meningite, requerem uma atenção ainda maior, devido à rápida ação no organismo e à alta taxa de mortalidade. Muitos tipos de vacinas foram desenvolvidas para combater essas doenças, entre elas as que utilizam o microrganismo atenuado, as que utilizam parte do mesmo e as contendo vesículas de membrana externa (OMVs), partículas produzidas naturalmente durante o crescimento da bactéria e que apresenta estrutura semelhante a da membrana externa da mesma. Para aumentar a eficiência dessas vacinas muitos foram os compostos utilizados como adjuvantes. O presente trabalho foca no desenvolvimento e análise de uma vacina contendo OMVs, como antígeno, e dois tipos de nanoestruturas de carbono (NTC e NTN), como adjuvantes, e na elaboração e aplicação de uma nova técnica de produção de OMVs. A produção de OMVs desenvolvida pelo grupo mostrou-se eficaz. Nesse novo processo foi analisada a cinética da liberação em diferentes linhagens. As cepas de C2135, IAL 2443 e B4 apresentaram uma liberação de OMVs distintas. A primeira desenvolveu uma produção ótima após 24 horas da inoculação das primeiras colônias. A segunda e a terceira produziram uma maior quantidade no período próximo a 12 horas após a inoculação. Essa diferença pode ser devido ao tipo das linhagens, no que diz respeito à estrutura capsular da bactéria, sendo a C2135 uma representante do tipo C e a IAL 2443 e B4 serem representantes do tipo B. As vacinas contendo somente OMV apresentaram um aumento na imunização dos modelos murinos quando comparadas ao controle positivo (soro humano vacinado com uma vacina comercial) contra as bactérias que produziram a OMV em questão. Os resultados das vacinas contra linha-

gens diferentes das suas bactérias progenitoras mostraram um resultado inferior quando comparadas ao controle positivo. As vacinas contendo OMV e o nanotubo NTC, como adjuvante, apresentaram também um resultado acima do obtido pelo controle positivo, porém não conseguiram apresentar uma resposta imune maior do que as que continham apenas OMV, deixando clara a baixa eficiência adjuvante desse composto. As contendo OMV e o nanotubo NTN apresentaram uma imunização, em alguns casos, abaixo da obtida pela vacina contendo somente OMV, o que indica uma diminuição na apresentação normal das OMVs ao sistema imune. Isso pode representar diversas possibilidades, entre elas uma diminuição na capacidade de reconhecimento dela como antígeno ou uma alteração na eficiência das ligações dos anticorpos com o antígeno. Este estudo atestou a qualidade do processo de produção de OMVs desenvolvido pelo grupo e mostrou a especificidade das vacinas produzidas. Já as nanestruturas de carbono utilizados não apresentaram função adjuvante, sendo que em alguns momentos houve inclusive diminuição da eficiência de imunização.

ABSTRACT

Bacterial diseases demands attention of health authorities. Those caused by the bacterium *Neisseria meningitidis*, like brain fever, require even more attention due to the fast action on the organism and the high mortality rate. Many types of vaccines have been developed to combat these diseases, including those made from weakened or killed forms of the microbe, its toxins and containing outer membrane vesicles (OMVs), blebs produced naturally during the bacterial growth. The OMVs have similar structure to the bacterial outer membrane. To increase the efficiency of vaccines several compounds have been used as adjuvants. The aim of this work is to develop and test a vaccine containing OMVs, as antigen, and two types of carbon nanostructures (NTC and NTN) as adjuvants, and develop and implement a novel technique for the production of OMVs. This technique developed by the group was very effective. In this new process the strains of the C2135, IAL 2443 and B4 showed a distinct release rate of OMVs. The first one showed an optimal production at 24 hours after the inoculation of the first colonies. The second and the third one after 12 hours. This may indicate that the two bacterial linages are different to each other regarding the kind of their capsular structure. OMV vaccines showed an increase in the immunization of murine models when compared with the results obtained by a commercial vaccine against the progenitor bacteria. OMV vaccines containing NTC nanotube as adjuvant also achieved better results than the commercial vaccine, but failed to produce a higher response than the previous treatment, making clear their low efficiency as a vaccine adjuvant. OMV vaccines containing NTN graphene promoted an immunization below that obtained by the OMV vaccine and OMV vaccine with NTC nanotube, indicating a decrease in the standard presentation

of OMVs to the immune system. This may represent several possibilities, such as a decrease in the ability to recognize the OMV as an antigen, or a decrease in the efficiency of the binding of antibodies to antigen. This study confirmed the efficiency and quality of the novel OMV production process. The carbon nanostructures (NTC and NTN) presented no adjuvant effect, moreover, in some cases, they reduced the effectiveness of immunization.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Modelo da biogênese das vesículas de membrana externa. Estão representados a membrana externa (ME), contendo lipopolissacarídeos (LPS), a camada de peptidoglicano (PG), o espaço periplasmático (Pp), a membrana interna (MI) e o citosol (Cit). Para a formação da vesícula ocorre a evaginação da membrana externa ao ponto de ocorrer o estrangulamento e liberação da mesma. Em destaque a vesícula já liberada com o conteúdo periplasmático no seu interior de seu lúmen.

19

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) (A), mostrando a morfologia do nanotubo multilamelar (NTC), e Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) (B), destacando a estrutura de multi-paredes do mesmo.

28

Figura 3: Cinética da produção de vesículas de membrana externa. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=3). Concentração proteica das OMVs obtidas a partir da *N. meningitidis* da linhagem (A) C2135, (B) IAL 2443 e (C) B4.

35

Figura 4: Microscopias eletrônicas de transmissão de amostras de vesículas de membrana externa da linhagem C2135. Setas indicam vesículas de tamanhos variados, aglomeradas (A) e não-aglomeradas (B, C e D).

37

Figura 5: Micrografias de cortes histológicos de hepatócitos de camundongos Swiss. Hepatócitos corados com Hematoxilina-Eosina dos animais tratados com o controle negativo (A) e dos tratados com a associação OMV da linhagem C2135 + Nanotubo de Carbono NTC (B).

39

Figura 6: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com

nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da mesma linhagem. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 40

Figura 7: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem IAL 2443. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 43

Figura 8: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem B4. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N.*

meningitidis associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 44

Figura 9: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem W135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 46

Figura 10: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem P2143. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 48

Figura 11: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da mesma linhagem. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$).

50

Figura 12: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem C2135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$).

52

Figura 13: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem B4. Valores

expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$).

54

Figura 14: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem W135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$).

56

Figura 15: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem P2143. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com

OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 58

Figura 16: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da mesma linhagem. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 60

Figura 17: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem C2135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao

nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 62

Figura 18: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem IAL 2443. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 64

Figura 19: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem W135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$). 65

Figura 20: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem P2143. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n=3$).

66

Tabela 1: Representação do conteúdo das vacinas produzidas para imunização dos animais.

A intersecção das linhas e colunas contendo um sinal (+) representa a presença do composto encontrado na coluna mais a esquerda. Na intersecção contendo um sinal (-) representa ausência do mesmo.

30

Tabela 2: Linhagens bacterianas de *N. meningitidis* utilizadas neste trabalho

32

LISTA DE ABREVIACÕES

BSA: “*bovine serum albumin*”, soro de albumina bovina;

CEMIB: Centro de Bioterismo;

CEUA: comissão de ética no uso de animais;

Cyt: citosol;

ELISA: “*enzyme-linked immunosorbent assay*”;

EPM: erro padrão médio;

HFCVD: “*hot filament chemical vapor deposition*”, deposição química, a partir da fase de vapor, assistida por filamento quente;

IAL: Instituto Adolfo Lutz;

IM: membrana interna;

LPS: lipopolissacarídeos;

MWCNT - “*Multi-Walled Carbon Nanotubes*”, nanotubos de carbono multilamelados;

NTN: Grafeno

OM: membrana externa;

OMV: “*outer membrane vesicles*”, vesícula de membrana externa;

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

PG: camada de peptidoglicano;

Pp: espaço periplasmático;

RPM: rotações por minuto;

SWCNT: “*Single-Walled Carbon Nanotubes*”, nanotubos de carbono de parede simples;

Tol-Pal: “*Tol-peptidoglycan-associated lipoprotein*”;

UFC: unidades formadoras de colônia;

INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis

A quantidade de bactérias que compreendem o gênero *Neisseria* é bastante elevada. Os principais componentes desse grupo a causar doenças em humanos são os microrganismos das espécies *meningitidis* e *gonorrhoeae*. Uma parcela significativa da população mundial possui a espécie *Neisseria meningitidis* colonizando de maneira comensal a mucosa do trato respiratório superior (Caugant *et al.*, 1994). Como se trata de um patógeno-ocasional, em indivíduos receptivos, a colonização assintomática pode dar lugar a uma infecção invasiva (De Vries *et al.*, 1996; Taha *et al.*, 2002), que pode ocorrer após um período de proliferação, culminando na entrada do microrganismo na circulação sistêmica através da própria mucosa (Brandtzaeg, 1995). Essa invasão pode gerar uma meningococemia e/ou meningite, causada pela entrada das bactérias nas meninges e que gera sintomas como febre, vômitos, rigidez na nuca, dentre outros sintomas (Devoe, 1982).

A classificação dos meningococos é determinada pelos seus diferentes tipos de cápsula, um polissacarídeo que envolve a bactéria e que determina a subdivisão da espécie em sorogrupos (Hitchcock *et al.*, 1986; Baehr *et al.*, 1989; Wong *et al.*, 1989; Hussey *et al.*, 1997). Existe um total de treze sorogrupos. Destes, cinco são associados com frequência a casos de invasão do organismo hospedeiro (Bakir *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2006; Chanteau *et al.*, 2007). São eles os sorogrupos A, B, C, Y e W135. Mais recentemente, outros sorogrupos têm também surgido com

características epidemiológicas como os sorogrupos 29E, X e Z (Etienne *et al.*, 1990; Bennett *et al.*, 2004; Safadi & Barros, 2006).

Existe um mecanismo natural de defesa do microrganismo contra o sistema imune do indivíduo infectado. Através dele, a bactéria pode produzir um novo tipo de cápsula diferente do que produz normalmente. Esse mecanismo é conhecido por *switch* capsular (Swartley *et al.*, 1997; Lancellotti *et al.*, 2006). Esse processo é possível graças à transferência de material genético entre as linhagens de *N. meningitidis* e à capacidade de incorporar naturalmente um DNA exógeno (Lancellotti *et al.*, 2006). Essa transferência, chamada de transmissão gênica horizontal, concede à bactéria receptora do material genético a capacidade de expressar essa nova cápsula (Swartley *et al.*, 1997; Zarantonelli *et al.*, 2006; Hollanda *et al.*, 2011; Mattos *et al.*, 2011).

A *N. meningitidis* não apresenta apenas a capacidade de expressar genes obtidos de bactérias da sua mesma espécie. Alguns polissacarídeos encontrados nela são semelhantes aos encontradas em *Haemophilus influenzae*, o que indica uma possível troca de material genético entre elas no curso da evolução (Frosch *et al.*, 1991; Maiden *et al.*, 1998; Achtman, 2004).

Histórico de Vacinas de meningococo

As primeiras vacinas foram desenvolvidas contra os sorogrupos A, C, W135 e Y. Elas eram constituídas de polissacarídeos capsulares purificados. Para o sorogrupo B, responsável pela maioria dos casos de meningites em diversas partes do mundo (Van Der Ley *et al.*, 1995), ainda não existe uma vacina desse tipo. Uma das possíveis explicações seria devido à presença da molécula de ácido α -2,8-N-acetil neuramínico na sua cápsula, molécula essa que é imunologicamen-

te semelhante ao ácido siálico humano. Isso impossibilitaria o reconhecimento dessa molécula pelo sistema imune, uma vez que resultaria no combate de estruturas do próprio organismo.

Uma alternativa para esse problema seria a utilização de outras estruturas da bactéria como antígenos, como proteínas expostas na sua membrana externa (Frasch, 1985; Frasc *et al.*, 1991; Comanducci *et al.*, 2002; Borrow *et al.*, 2005). Como as vesículas de membrana externa (*Outer membrane vesicles* - OMVs) produzidas por ela possuem as mesmas características estruturais das suas membranas externas, uma vacina utilizando essas vesículas se mostra uma opção de grande utilização.

Todas as vacinas contra meningococos do sorogrupo B disponíveis comercialmente e em testes clínicos são baseadas em OMVs. Entre as comercializadas, encontra-se a vacina cubana, VA-MENGOC-BC® extraída da cepa Cu385/83 e polissacarídeo do grupo C (PSC) (Milagres *et al.*, 1994; Milagres *et al.*, 1998), a vacina norueguesa, Folkehelsa®, formulada com OMV extraídas da cepa 44/76 (Zollinger *et al.*, 1997; Pollard & Scheifele, 2001; Collins & Pollard, 2002) e a vacina hexavalente holandesa Hexamen, composta de OMVs de duas cepas cada uma expressando três subtipos diferentes de porina A (Claassen *et al.*, 1996; Van Der Voort *et al.*, 1997; Peeters *et al.*, 1999).

Em função da situação epidemiológica no Brasil, no final dos anos 80, foi administrada a vacina VA-MENGOC-BC®, em crianças e adolescentes, na faixa etária que compreende dos três meses aos nove anos de idade com duas doses. A eficácia da vacina foi avaliada pelo Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, em iniciativa conjunta da Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo e da Organização Panamericana de Saúde, em colaboração com a Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos. Concluiu-se que a vacina cubana era dependente da idade, sendo que nenhuma proteção era observada em crianças menores de 24 meses (Milagres *et al.*, 1994; Mor-

ley *et al.*, 2001; Morley *et al.*, 2001; Jodar *et al.*, 2002). Doze meses após a segunda dose, a eficácia geral da vacina foi de 54-57% com comprovação de ausência de resposta em crianças menores de 2 anos, que corresponde à faixa etária de maior risco para o desenvolvimento dessa doença (De Moraes *et al.*, 1992; Milagres *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1995). Esses resultados foram posteriormente confirmados em ensaios clínicos com a mesma vacina cubana, no Chile (Boslego *et al.*, 1995).

Vesícula de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles* - OMV)

Uma extensa quantidade de bactérias Gram-negativas como, *N. meningitidis*, liberam, durante o seu crescimento, vesículas de membrana externa (Li *et al.*, 1998). Essas partículas são produzidas pela projeção natural da membrana externa dessas bactérias, que, devido ao rompimento dessas projeções, formam tais estruturas (Figura 1).

Esses proteolipossomos possuem entre 10 e 200 nm de diâmetro e sua formação pode estar associada à pressão de turgor do envelope celular durante o crescimento bacteriano (Zhou *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1997). Defeitos na ligação de proteínas da membrana externa com a camada de peptidoglicano ou de proteínas envolvidas na ligação estrutural entre membrana interna, externa e camada de peptidoglicano podem resultar em uma massiva liberação dessas nanopartículas naturais (Henry *et al.*, 2004).

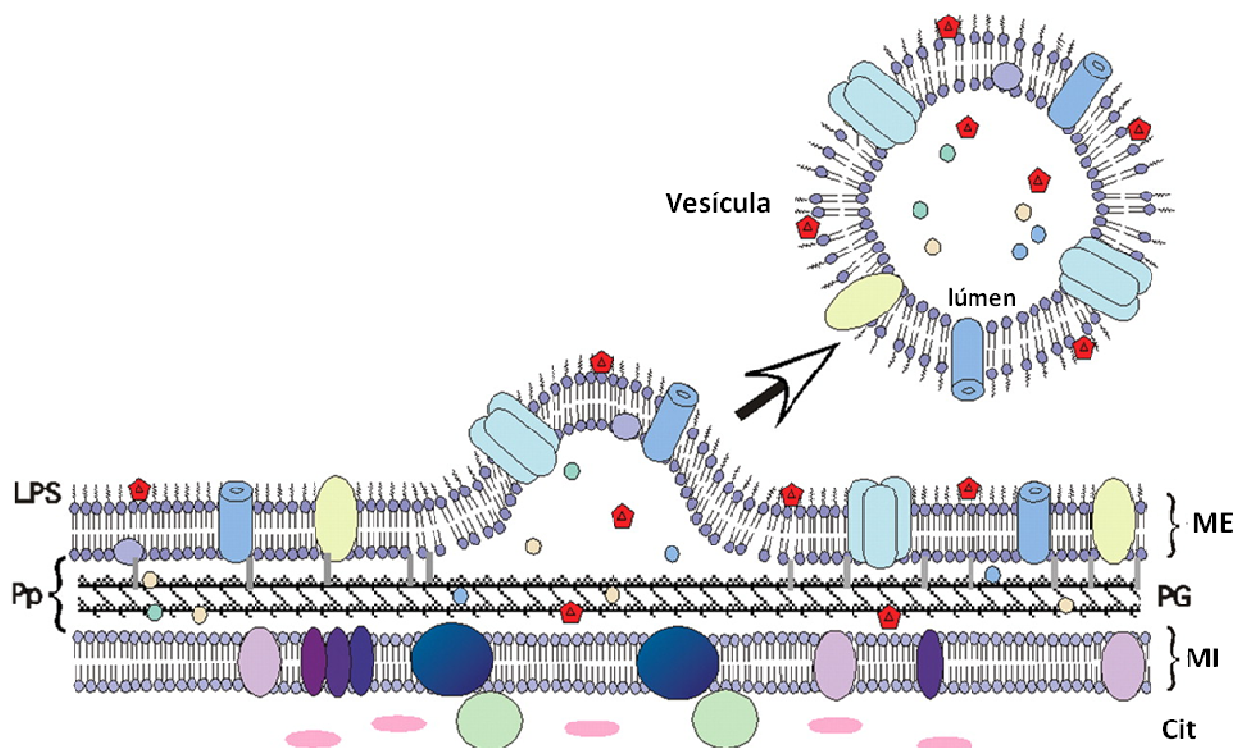


Figura 1: Modelo da biogênese das vesículas de membrana externa. Estão representados a membrana externa (ME), contendo lipopolissacarídeos (LPS), a camada de peptidoglicano (PG), o espaço periplasmático (Pp), a membrana interna (MI) e o citosol (Cit). Para a formação da vesícula ocorre a evaginação da membrana externa ao ponto de ocorrer o estrangulamento e liberação da mesma. Em destaque a vesícula já liberada com o conteúdo periplasmático no seu interior de seu lúmen (Figura adaptada de Kuehn & Kesty, 2005).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas possuem proteínas como as porinas, as mais abundantes na superfície dos meningococos (Van Der Ley *et al.*, 2001), receptores e poros, e uma distribuição assimétrica de lipídios, com a face externa da membrana composta principalmente de lipopolissacarídeos (LPS) e a face interna da mesma contendo fosfolipídeos e lipoproteínas. O periplasma contém a camada de peptidoglicano, proteínas e enzimas de regulação, e componentes da via secretora (Kuehn & Kesty, 2005).

Algumas análises bioquímicas demonstraram que as OMVs são constituídas dessas proteínas e lipídios da membrana externa da bactéria progenitora e do conteúdo do periplasma. Não foram encontrados componentes da membrana interna e nem do citoplasma (McBroom *et al.*, 2006). Esse fato confere a essa partícula uma poderosa ferramenta para produção de vacinas, uma vez que, utilizando essas vesículas, os antígenos presentes na superfície da membrana externa podem ser apresentados ao sistema imune sem o risco de uma contaminação, fato que pode ocorrer em uma vacina contendo o microrganismo atenuado (Jodar *et al.*, 2002[a]; Jodar *et al.*, 2002[b]).

Novo Processo de Produção de OMVs

Muitas são as formas de extração das OMVs. A utilização de centrifugações sequenciais aliadas à ultracentrifugação é uma delas (Claassen *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2007). Há, porém, algumas problemáticas associadas a esses tipos de metodologia quando existe a intenção de aumentar a escala de produção.

Alguns pesquisadores lançam mão de compostos, como o desoxicolato, que desestabilizam a membrana externa da bactéria a fim de obter a liberação dessas vesículas mais facilmente (Claassen *et al.*, 1996). Porém, o próprio desoxicolato em altas concentrações, acima do nível fisiológico, pode ativar diversas vias de resposta ao estresse, por exemplo, a apoptose de vários tipos celulares, danos ao DNA, problemas de formação estrutural de proteínas, dentre outros (Crowley *et al.*, 2000).

Alternativamente, é possível utilizar a ultrafiltração para conseguir expressivos resultados na obtenção dessas partículas. Essa metodologia consiste em passar por um filtro com um poro

muito pequeno uma suspensão de meio de cultura contendo as OMVs liberadas naturalmente pelas bactérias (dados não publicados).

Existem ainda trabalhos que utilizam de técnica de biologia molecular para modificar o sistema de proteínas Tol-Pal desestruturando a membrana bacteriana e induzindo a liberação de uma grande quantidade de OMVs (Bernadac *et al.*, 1998; Cascales *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2004).

Adjuvantes Vacinais

Adjuvantes são chamados as substâncias que são associadas às vacinas com o propósito de amplificar e/ou modular a imunogenicidade de um determinado antígeno. São capazes também de modular a resposta imune em indivíduos que possuem certa deficiência para tal, como idosos, imunodeprimidos ou aqueles que são encontrados em condições de insalubridade ou subnutrição (Tacket & Mason, 1999; Tacket *et al.*, 1999; Schinjs, 2000).

Os compostos de alumínio são muito utilizados como adjuvantes. O fosfato de alumínio e o hidróxido de alumínio foram aprovados para uso clínico (Pashine *et al.*, 2005; Lima, 2008). Eles induzem um aumento significativo na resposta imune do organismo (Cox & Coulter, 1997). O monofosforil lipídeo A (MPLA) também tem larga utilização (Quintilio *et al.*, 2009), principalmente associado a outros compostos como o próprio alumínio ou a fração purificada do extrato da saponina. Outras substâncias podem agir como adjuvantes, porém o maior empecilho para o avanço desses compostos até o teste clínico é a alta toxicidade e o possível caso de hipersensibilidade que alguns deles causam (O'Hagan *et al.*, 2001)

Dentro da área de conhecimento intitulada Nanotecnologia, existe uma vertente que se especializa em estudar moléculas em escala nanométrica com aplicações biológicas como marcadores para rápida detecção de doenças (Jolanta *et al.*, 2005; Dudu *et al.*, 2012), desenvolvimento de cosméticos (Farboud *et al.*, 2011) vacinas (Nasir, 2009) e diversas outras.

Algumas nanoestruturas também são utilizadas em microrganismos desde 2004 (Zhao & Feng, 2004). Dentre essas destacam-se as aplicadas na análise da atividade antimicrobiana (Zhao & Feng, 2004) e na alteração do processo de transformação bacteriana (Hollanda *et al.*, 2011; Mattos *et al.*, 2011). A aplicação de nanopartículas como adjuvante vacinal foi alvo de alguns estudos (Hollanda, *et al.*, 2011) provando ser uma crescente área de pesquisa.

Nanoestruturas de Carbono

As aplicabilidades das nanoestruturas de carbono, como os nanotubos de parede simples (*Single-Walled Carbon Nanotubes* – SWCNTs) e os de paredes múltiplas (*Multi-Walled Carbon Nanotubes* – MWCNTs), e outras estruturas como o grafeno, são extensas e variadas (Terrones, 2003).

Os nanotubos de carbono possuem larga aplicação nas diversas áreas da engenharia, como por exemplo, na produção de equipamentos eletrônicos (Tans *et al.*, 1998), no desenvolvimento de células combustíveis para automóveis movidos a H_2 , pela capacidade que os nanotubos possuem de armazenar gases após alguns tratamentos (Terrones, 2003) e na utilização para produção de baterias Li-ion (Frackowiak & Béguin, 2002).

Existe uma ampla aplicação desses nanotubos na área da saúde também, como novos sistemas de administração de fármacos (*drug delivery*) e terapias contra diversos cânceres (Kam *et al.*, 2005). Na área da microbiologia, Mattos *et al.*, em 2011, revelaram a capacidade dos MWCNTs em aumentar a transformação bacteriana em *N. meningitidis*.

Já o grafeno, que é uma estrutura bidimensional que possui um átomo de carbono de espessura, é considerada a mais rígida já produzida (Zan *et al.*, 2012) e possui diversas aplicações que vão desde a engenharia de materiais, devido à sua característica já citada, até a capacidade de realizar a dessalinização de amostras de água marinha com eficiência de 100 a 1000 vezes maior que os demais processos (Cohen-Tanugi & Grossman, 2012).

A capacidade adjuvante desses tipos de materiais ainda não foi testada, porém os resultados obtidos por outras nanoestruturas, como os nanotubos de sílica que demonstraram resultados promissores, o que sugere uma possível aplicação nesse sentido (Alves D. A., 2012, Dissertação de Mestrado), podem indicar uma convergência para esse tipo de estudo.

OBJETIVOS

Foi proposta desse trabalho elaborar um novo protocolo de produção de OMV's na tentativa de reduzir os custos da metodologia, de possibilitar um possível aumento de escala e de eliminar a necessidade de utilização de alguns compostos surfactantes que possam vir a ser prejudiciais a saúde, fornecendo assim uma alternativa aos processos de produção já existentes.

Um segundo objetivo do trabalho foi a análise da eficiência da capacidade adjuvante de dois tipos de nanoestruturas de carbono (nanotubo multilamelar e grafeno) em vacinas contra algumas cepas de meningococo, utilizando, para isso, as OMVs produzidas pelo método desenvolvido pelo grupo e contrapondo-as frente a diferentes linhagens de meningococo, visando a verificação de um possível aumento da cobertura vacinal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção das Vesículas de Membrana Externa

Para obtenção das vesículas de membrana externa oriundas de cepas de *N. meningitidis* primeiramente foi realizado um teste para analisar a cinética da produção dessas nanopartículas. Para tal, foram preparados meios de cultura sólidos com crescimento bacteriano de três linhagens diferentes, sendo elas: C2135, IAL 2443 e B4. Dos crescimentos foram ressuspensos, em 50 mL de meio líquido, uma quantidade equivalente a duas vezes o valor 10 da escala de Macfarland, a fim de obter uma saturação de bactérias do meio. Do total de 50 mL, 10 mL foram aplicados em garrafas de Roux, perfazendo um total de quatro garrafas, contendo meio de cultura apropriado para o crescimento dos meningococos. Cada uma das quatro garrafas de Roux foi incubada em estufa a 37°C por, respectivamente, 8, 12, 16 e 24 horas, para as linhagens C2135 e IAL 2443, para constatação dos valores ótimos de produção de OMV.

Ao atingir os seus horários correspondentes, cada garrafa de Roux foi retirada da estufa. A ela aplicou-se um total de 30 mL de PBS e aproximadamente 25 unidades de pérolas de vidro, para, através do choque mecânico proporcionado através de uma leve movimentação da garrafa de roux, facilitar a extração das OMVs. Subsequentemente, esse tampão, contendo as OMVs e as células que possivelmente se desprenderam do meio sólido, foi armazenado em tubos de centrifuga esterilizados e passou por uma centrifugação de 4000 RPM por 10 min para que os materiais de maior densidade contidos no líquido (células e outros materiais de maior massa) sofressem uma primeira separação. Após essa centrifugação, todo o sobrenadante foi separado em um novo tubo de centrifuga.

Esse sobrenadante passou por uma filtração à vácuo, através de um filtro produzido pela MILLIPORE® e de uma bomba, que proporcionou a produção da pressão negativa essencial à esse processo. O filtro utilizado foi o MILLIPORE® Membrane Filters com porosidade de 0,025 µm, que permitiu a retenção das nanopartículas bacterianas. O filtrado foi descartado e o conteúdo retido no filtro foi ressuspenso em tampão PBS e armazenado em biofreezer à -85°C.

Para determinar a concentração das OMVs obtidas, foi adotada a metodologia de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o soro albumina bovina (BSA) como padrão (Claassen *et al.*, 1996; Deich & Hoyer, 1982). Para tal foi utilizado o Reagente Corante Concentrado BioAgency® (cod. 500-0006N) a 595 nm. A partir dos dados de concentração proteica foi estimado o período ótimo de incubação.

Caracterização das Nanopartículas Bacterianas

Para caracterizar as nanopartículas obtidas dos meningococos foram utilizadas duas metodologias: o ensaio protéico de Bradford, já descrito no item acima e a microscopia eletrônica de transmissão.

Para a microscopia eletrônica foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E a uma voltagem de 80 kV. Foram utilizados *grids* com filme suporte formvar 2,5% diluído em dicloroetano e recoberto com filme de carbono. Como contrastante foi utilizado ácido fosfotúngstico.

Nanoestruturas de Carbono

As nanoestruturas de carbono, que foram gentilmente cedidas pela equipe do Profº Dr. Vitor Baranauskas, foram obtidas através do método da deposição química, a partir da fase de vapor, assistida por filamento quente (*Hot Filament Chemical Vapor Deposition* – HFCVD). O procedimento para a produção e caracterização destas nanoestruturas foram descritos no artigo de Mattos *et al.* (2011) anexado ao trabalho.

Foram utilizados dois tipos de nanoestruturas de carbono: (1) um nanotubo de carbono multi-parede (MWCNT – chamado no decorrer do trabalho de NTC) e (2) uma nanoestrutura feita a partir do grafeno (chamado no decorrer do trabalho de NTN).

É possível observar na Figura 2 microscopias eletrônicas do nanotubo de carbono NTC.

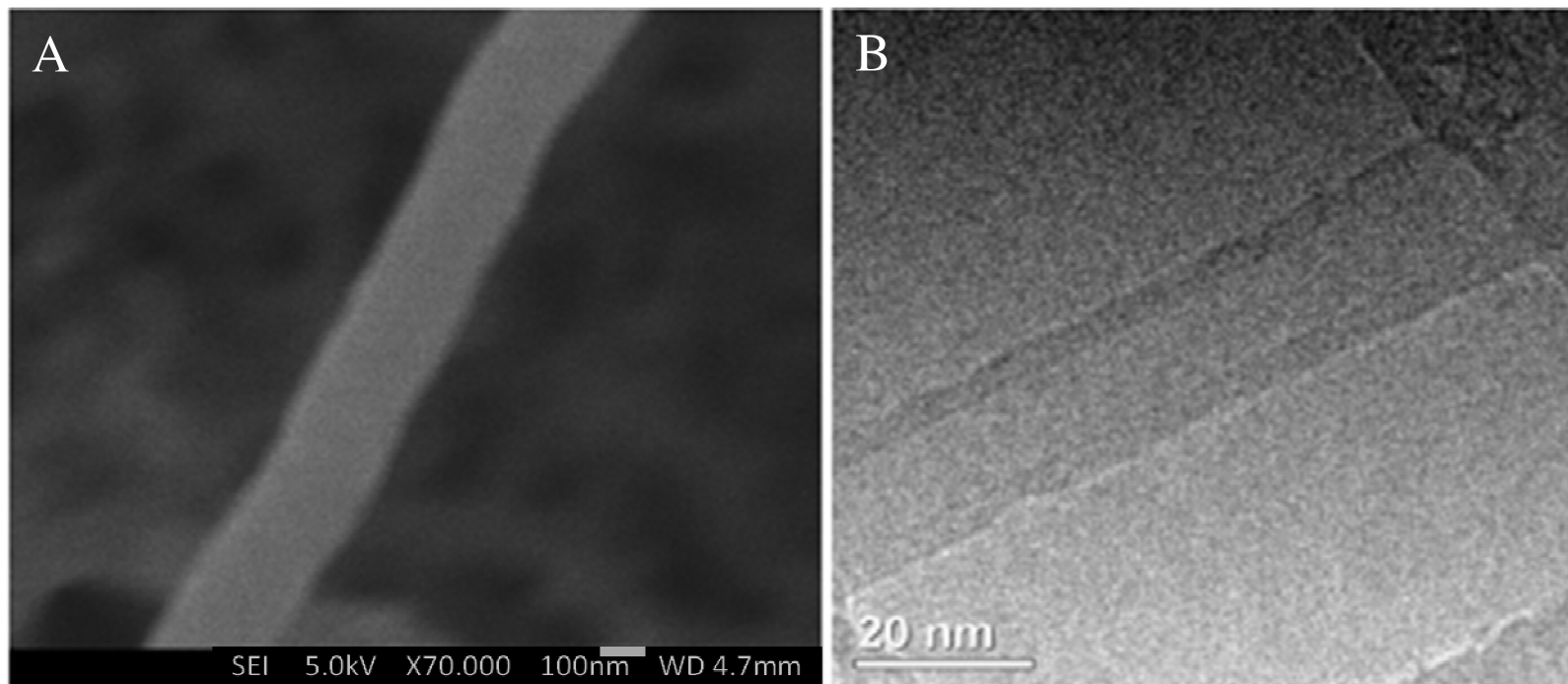


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) (A), mostrando a morfologia do nanotubo multi-lamelar (NTC), e Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) (B), destacando a estrutura de multi-paredes do mesmo (Mattos *et al.*, 2011)

Preparação das Vacinas de OMV

Foi realizada a preparação de dez vacinas: contendo apenas o veículo (PBS); contendo o veículo e 2 µg de proteínas totais (valor estimado através do ensaio de Bradford) da OMV obtida a partir da linhagem C2135 ou da IAL 2443 ou da B4; contendo a base da anterior e 500 ng de NTC ou NTN.

As vacinas contendo as nanoestruturas de carbono foram preparadas no momento da inoculação nos animais, a fim de evitar possíveis erros causados pela precipitação das nanoestruturas. O estoque dessas nanoestruturas de carbono sofreu agitação vigorosa por 30 segundos. Após esse procedimento, 500 ng do mesmo foi adicionado a uma injeção para que ela fosse aplicada no animal em seguida.

Não foi analisada a maneira como as nanoestruturas de carbono e as OMVs interagem.

Na Tabela 1 é apresentada uma representação esquemática do conteúdo das vacinas produzidas.

Tabela 1: Representação do conteúdo das vacinas produzidas para imunização dos animais.

A intersecção das linhas e colunas contendo um sinal (+) representa a presença do composto encontrado na coluna mais a esquerda. Na intersecção contendo um sinal (-) representa ausência do mesmo.

	C-	C2135	C2135+NTC	C2135+NTN	IAL 2443	IAL 2443+NTC	IAL 2443+NTN	B4	B4+NTC	B4+NTN
OMV	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NTC	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
NTN	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Experimentação Animal

Para a análise imune em modelos murinos foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com idade entre 3 a 4 semanas, provenientes do CEMIB - UNICAMP. Todos os animais foram insensibilizados através da injeção intraperitoneal de uma mistura de Ketamina e Xilasina nas concentrações de 100 mg/kg e 7 mg/kg, respectivamente. Os animais foram imunizados através das vacinas de OMV e das de OMV associada ao nanotubo de carbono. Foram duas aplicações, em intervalos de sete dias entre elas. Passados sete dias da segunda aplicação, os animais foram anestesiados e o sangue total dos animais foi coletado com o auxílio de capilares pró-

prios para tal. O soro obtido foi utilizado para a realização do teste de ELISA. Os animais foram submetidos à eutanásia através do deslocamento cervical e o fígado foi rapidamente retirado e separado para a análise histológica.

O protocolo de experimentação animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IB-UNICAMP), sob o número: 2185-1 como atesta o documento anexo.

Hepatotoxicidade das Nanopartículas

A hepatotoxicidade foi analisada através de cortes histológicos dos fígados dos animais utilizados no trabalho. Para tal, o órgão retirado foi seccionado e fixado em lâminas de vidro para observação em microscópio de luz. O tecido em questão foi desidratado, incluído em uma resina própria e passou pelo micrótomo. Esse corte passou pelo processo de coloração, nesse caso hematoxilina-eosina.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio de ELISA permitiu a análise da resposta imune dos modelos murinos. Para a realização da metodologia, utilizada como descrita por Sulahian *et al.* (1996), foram utilizadas placas de 96 poços contendo ao fundo uma “*coating*” bacteriano. As bactérias crescidas em meio próprio foram ressuspensas em PBS.

Essa deposição bacteriana foi produzida através do crescimento de diversos tipos de bactérias, sendo elas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Linhagens bacterianas de *N. meningitidis* utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Características	Origem
<i>N. meningitidis</i> P2143	C:NT:P1.18-1,3 Cluster A4, ST8, liquor, Brasil - BA	INCQS - FIOCRUZ
<i>N. meningitidis</i> C2135	Sorogrupo C, BIOMERIEUX C2135	INCQS – FIOCRUZ
<i>N. meningitidis</i> W135	Sorogrupo W135, ATCC35559	INCQS – FIOCRUZ
<i>N. meningitidis</i> B-epi	<i>N. meningitidis</i> epidêmica brasileira isolada pelo Instituto Adolfo LUTZ	IAL – SP
<i>N. meningitidis</i> B4	<i>N. meningitidis</i> B4:P1-16 padrão.	IAL – SP
<i>N. meningitidis</i> W135 Marseille	<i>N. meningitidis</i> do sorogrupo W135 isolada na cidade de Marseille-France proveniente do surto W135 ST11 (ET37) Hajj.	IP - França

IAL – Instituto Adolfo Lutz - SP; INCQS – FIOCRUZ – Instituto Nacional de Controle de Qualidade - Fundação Oswaldo

Cruz - RJ; IP – França – Centre National de Référence des Ménigocoques – Institut Pasteur De Paris – França.

Os tubos contendo os microrganismos foram mantidos por uma hora a 56 °C para inativação dos mesmos e, posteriormente, diluídos à densidade óptica de 0,5 na Escala de Macfarland (10^8 UFC/mL). Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi adicionada a cada poço da placa e a mesma foi mantida por 24 horas a 37 °C. O sangue total, coletado dos animais, passou por uma centrifugação, a 4000 RPM, durante 15 minutos. O sobrenadante (soro) foi recolhido e armazenado a 4 °C. Na placa, contendo o *coating* bacteriano, foi adicionado o soro num título inicial de 1:500. Uma diluição seriada na razão 1:2 foi aplicada até que o último poço tivesse um título de 1:32000.

O anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase, foi aplicado aos poços e a placa foi mantida por uma hora a 37 °C. Após algumas lavagens foi aplicada a solução reveladora e em seguida a placa foi analisada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 492 nm.

Para o controle positivo do ensaio de ELISA foi utilizado o soro extraído do sangue de um humano que possui anticorpos contra os meningococos analisados.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O número de amostras usados em cada análise está indicado entre parênteses (n). Os dados experimentais foram analisados utilizando teste “t” de Student. No caso os testes de normalidade (Kolmogorov e Smirnov) que acusaram heterogeneidade de variância, um teste não paramétrico foi utilizado (Tukey). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinética da Produção de OMVs

A utilização do ensaio de Bradford para quantificação indireta, a partir da concentração de proteínas totais, de vesículas de membrana externa já foi descrita na literatura (Deich & Hoyer, 1982; Van der Ley *et al.*, 1991; Claassen *et al.*, 1996). Esse tipo de análise quantitativa se mostra muito útil, uma vez que são poucos os métodos encontrados para tal. Assim, a quantidade de proteínas presente em uma dada amostra de OMVs é considerada fator determinante para estimar a quantidade dessa partícula, embora o número de unidades da mesma não seja possível inferir através dessa técnica.

A cinética da produção de vesículas de membrana externa, como é apresentado na Figura 3, que foi analisada pela metodologia de Bradford, ao longo do tempo para cada uma das linhagens bacterianas de *N. meningitidis* utilizadas.

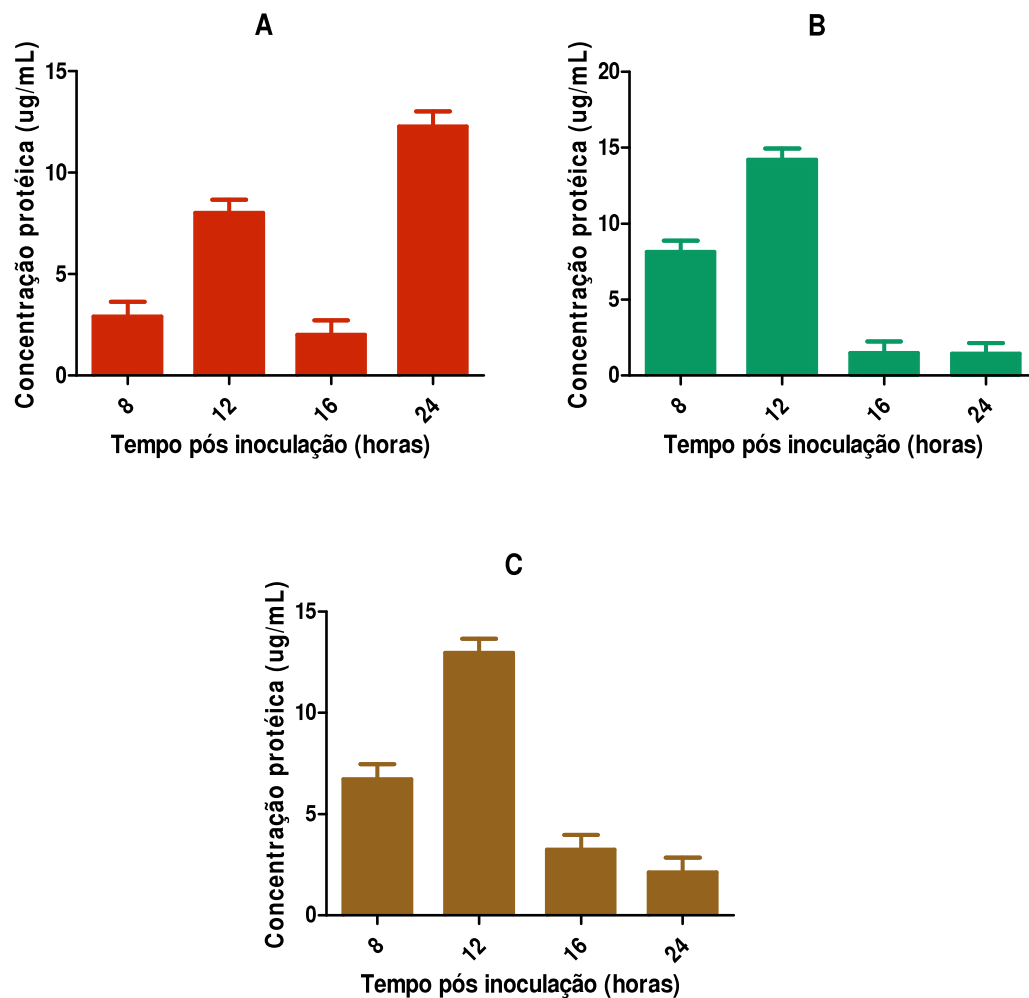


Figura 3: Cinética da produção de vesículas de membrana externa. Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=3). Concentração proteica das OMVs obtidas a partir da *N. meningitidis* da linhagem (A) C2135, (B) IAL 2443 e (C) B4.

Os resultados obtidos mostram uma maior produção de OMVs da linhagem C2135 após 24 horas de inoculação no meio de cultura (Fig. 3A) e em torno de 12 horas nas linhagens IAL 2443 (Fig. 3B) e B4 (Fig. 3C). Esses resultados revelam que pode haver uma diferenciação na

liberação das vesículas dependendo do tempo e da linhagem de origem. No experimento, as bactérias da linhagem C2135, pertencentes ao sorogrupo C, apresentaram um maior valor de concentração proteica em um período diferente quando comparado aos valores obtidos pelas bactérias pertencentes ao sorogrupo B (IAL 2443 e B4). Por sua vez, as bactérias desse último sorogrupo apresentaram um perfil semelhante de liberação de vesículas. Pela análise desses resultados, pode-se inferir que o tipo capsular pode ser um importante fator que interfere no tempo de liberação natural dessas vesículas.

Microscopia Eletrônica das Vesículas

As microscopias apresentadas na Figura 4 mostram algumas OMVs oriundas do processo de produção desenvolvido pelo grupo. As vesículas em questão foram obtidas a partir de *N. meningitidis* da linhagem C2135.

É possível perceber as OMVs apresentando-se de maneira aglomerada (Fig. 4A) e isolada (Fig. 4B, 4C, 4D) das demais. Como se pode observar pelas imagens, as vesículas não apresentam um tamanho específico, variando entre 50 e 100 nm, aproximadamente, o que é esperado, uma vez que a sua produção acontece de maneira aleatória. Através dessas microscopias é possível constatar que o processo de produção de OMVs desenvolvido pelo grupo foi bem sucedido. Não há, através desse tipo de análise, a possibilidade de mensurar quantitativamente a produção.

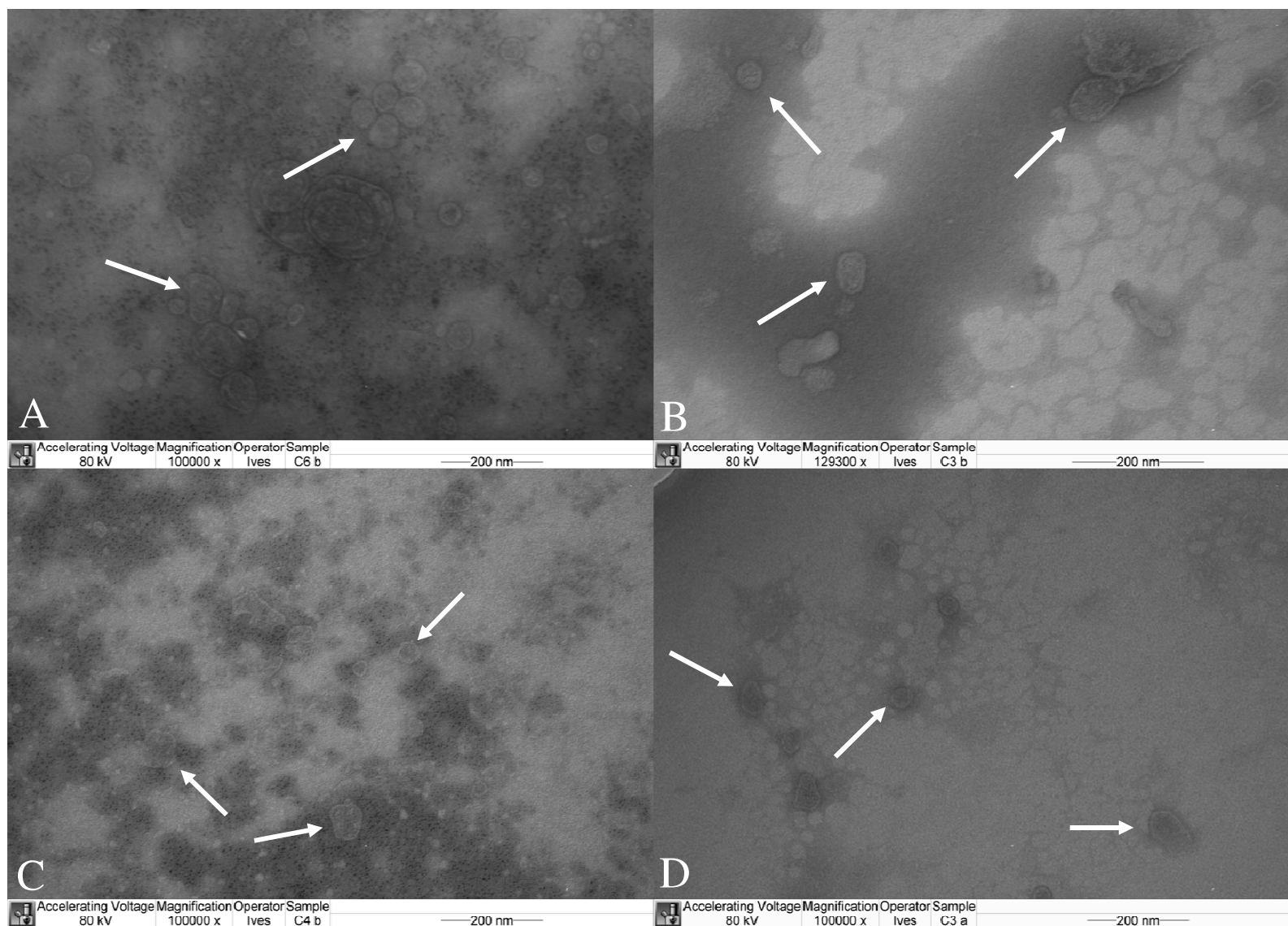


Figura 4: Microscopias eletrônicas de transmissão de amostras de vesículas de membrana externa da linhagem C2135. Setas indicam vesículas de tamanhos variados, aglomeradas (A) e não-aglomeradas (B, C e D).

Hepatotoxicidade das Nanopartículas

Os hepatócitos dos modelos murinos tratados com a vacina de OMV+NTC (Fig. 5B) não sofreram qualquer alteração morfológica aparente quando comparados com hepatócitos dos animais tratados com o veículo (PBS – controle negativo, Fig. 5A). Isso mostra que o fígado dos animais tratados não sofreu variação morfológica, que poderia indicar uma possível toxicidade dos compostos. Esses dados corroboram com alguns trabalhos que indicam a baixa toxicidade das nanoestruturas em algumas células (Kam *et al.*, 2005).

Apenas os hepatócitos dos animais tratados com a vacina de OMV obtida da linhagem C2135 de *N. meningitidis* associada ao nanotubo de carbono (NTC) estão representados na Figura 5B. As demais micrografias (dos animais vacinados com OMVs de IAL 2443, B4 e respectivas associações com as nanoestruturas de carbono) apresentaram hepatócitos com aspecto semelhante aos observados nessa figura (figuras não apresentadas).

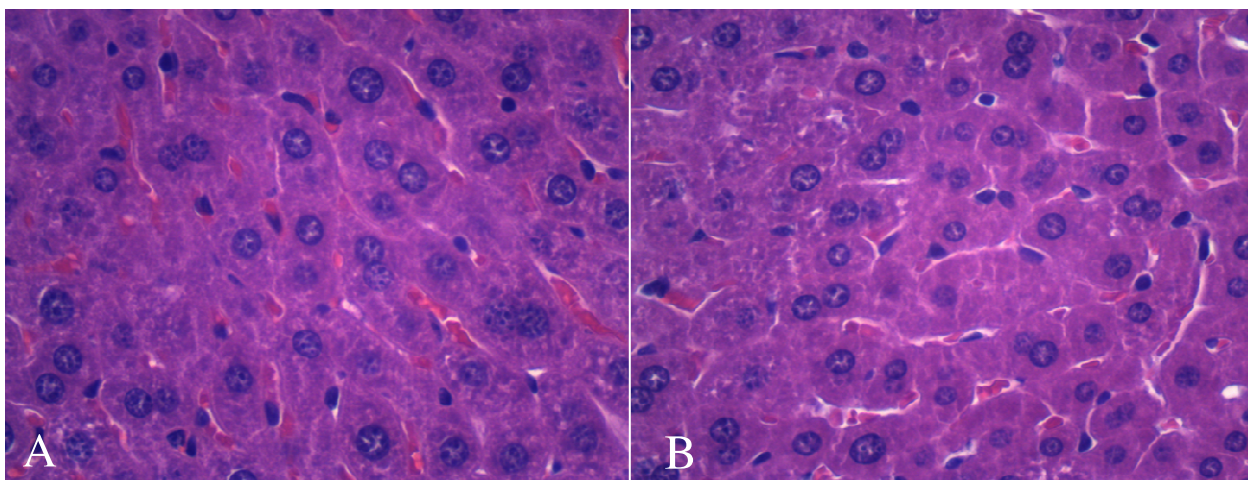


Figura 5: Micrografias de cortes histológicos de hepatócitos de camundongos Swiss. Hepatócitos corados com Hematoxilina-Eosina (aumento 40x) dos animais tratados com o controle negativo (A) e dos tratados com a associação OMV da linhagem C2135 + Nanotubo de Carbono NTC (B).

Análises da Resposta Imune dos Camundongos Vacinados

Análise da Resposta Imune Utilizando Vacinas de OMVs Provenientes da Linhagem C2135

A resposta dos anticorpos contidos no soro dos animais tratados com as vacinas de OMV oriundas da linhagem C2135 foi analisada através da técnica de ELISA. Nesse primeiro momento, o soro foi testado contra a própria linhagem C2135 de *N. meningitidis*. A Figura 6 apresenta um aumento significativo na produção de anticorpos contra a bactéria nas três primeiras titulações do soro (1/500; 1/1000; 1/2000), obtido a partir da imunização com a vacina contendo apenas as OMVs de C2135, quando comparado o controle positivo. As vacinas de OMV de

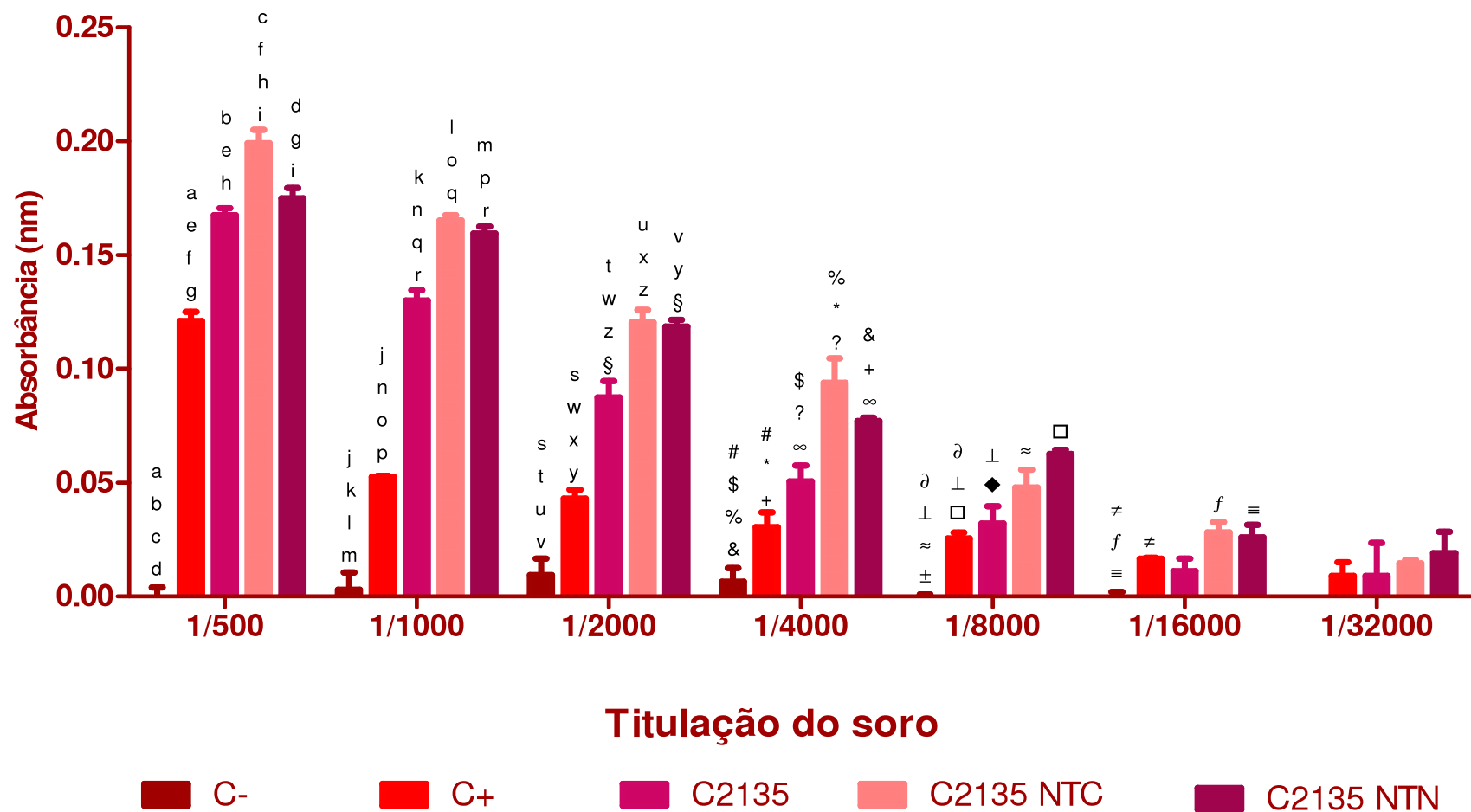


Figura 6: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da mesma linhagem. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

C2135+NTC e OMV de C2135+NTN também apresentaram um ligeiro aumento, em relação ao controle positivo, nas três primeiras diluições.

Nas condições em que o experimento foi realizado não é possível afirmar com completa certeza que houve um aumento na resposta imune. Em algumas titulações houve um aumento significativo, como é o caso do soro obtido a partir da imunização com OMV C2135+NTC e com OMV C2135+NTN, comparados aos resultados da vacina de OMV C2135. Porém esse foi um evento esporádico.

É possível notar ainda que com o aumento da diluição há a diminuição dos efeitos da resposta contra os anticorpos contidos no soro.

Salienta-se que a linhagem de extração das OMVs, C2135 é uma cepa vacinal utilizada pelos laboratórios da Empresa Merial como doadora de polissacarídeo capsular.

A análise de ELISA utilizando o soro dos mesmos animais tratados no experimento anterior foi realizada contra a linhagem IAL 2443 do meningococo. É possível notar que o aumento na resposta imune do animal tratado com a vacina de OMV de C2135, comparado com o controle positivo, observado na Figura 6, não se faz presente quando o ensaio é realizado utilizando um *coating* de uma *N. meningitidis* de linhagem diferente da que gerou as vesículas para a preparação da vacina (Figura 8). Isso pode estar relacionado a uma possível especificidade que essa vacina possua.

Não houve, nesse caso também, o aumento da resposta imune dos animais tratados com as nanoestruturas. É possível notar um ligeiro aumento, no caso do soro tratado com o nanotubo NTC, porém, mais uma vez, os resultados são inconsistentes, e por essa razão não é possível afirmar que o composto funcionou como adjuvante. Esses resultados são semelhantes aos apresentados na Figura 8, que mostra os dados da mesma formulação vacinal contra a linhagem B4 de *N.*

meningitidis. Essa semelhança pode ser devido ao fato de ambas as linhagens (apresentadas na Figura 7 e 8), que serviram como base para a ligação dos anticorpos contidos nos soros, serem do tipo B.

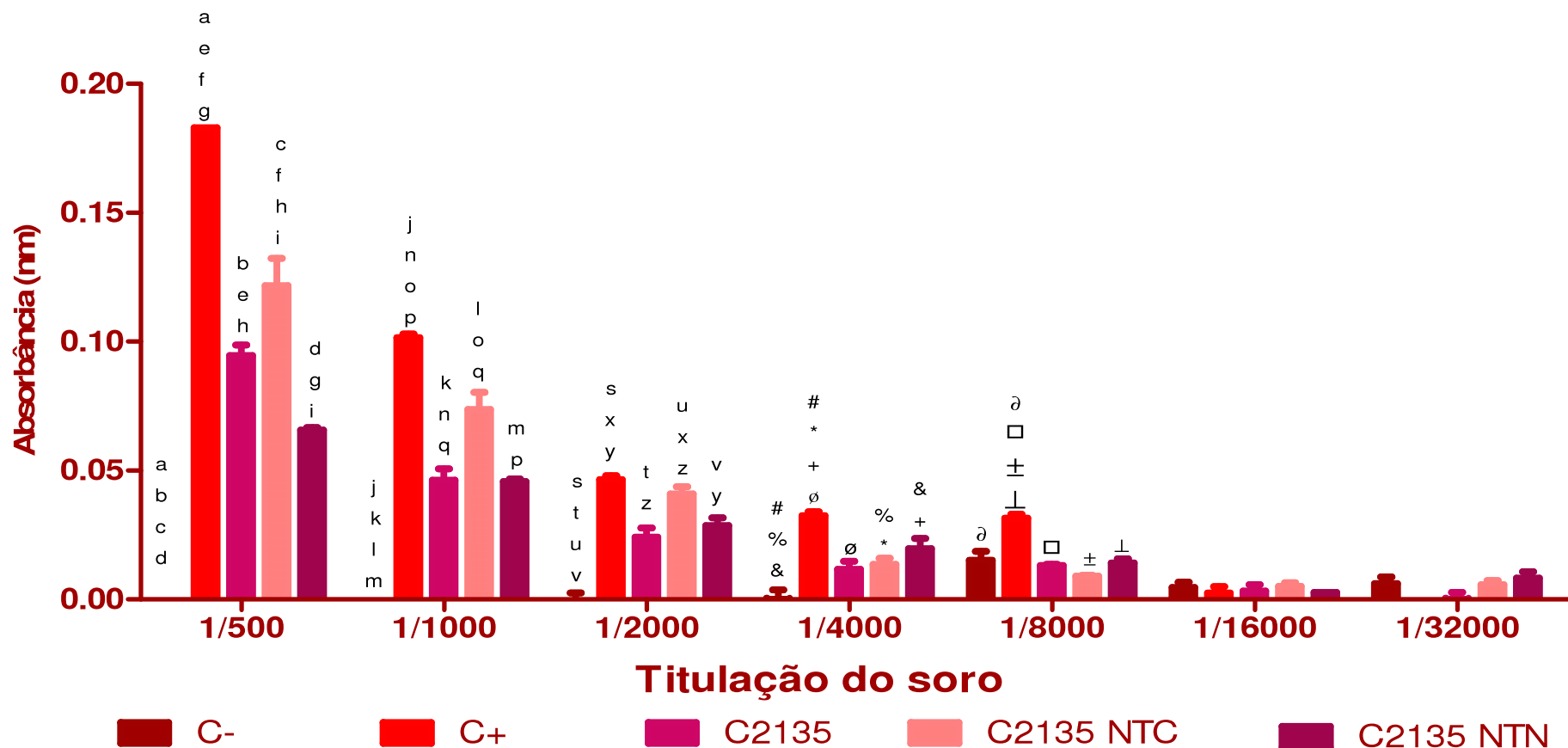


Figura 7: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem IAL 2443. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

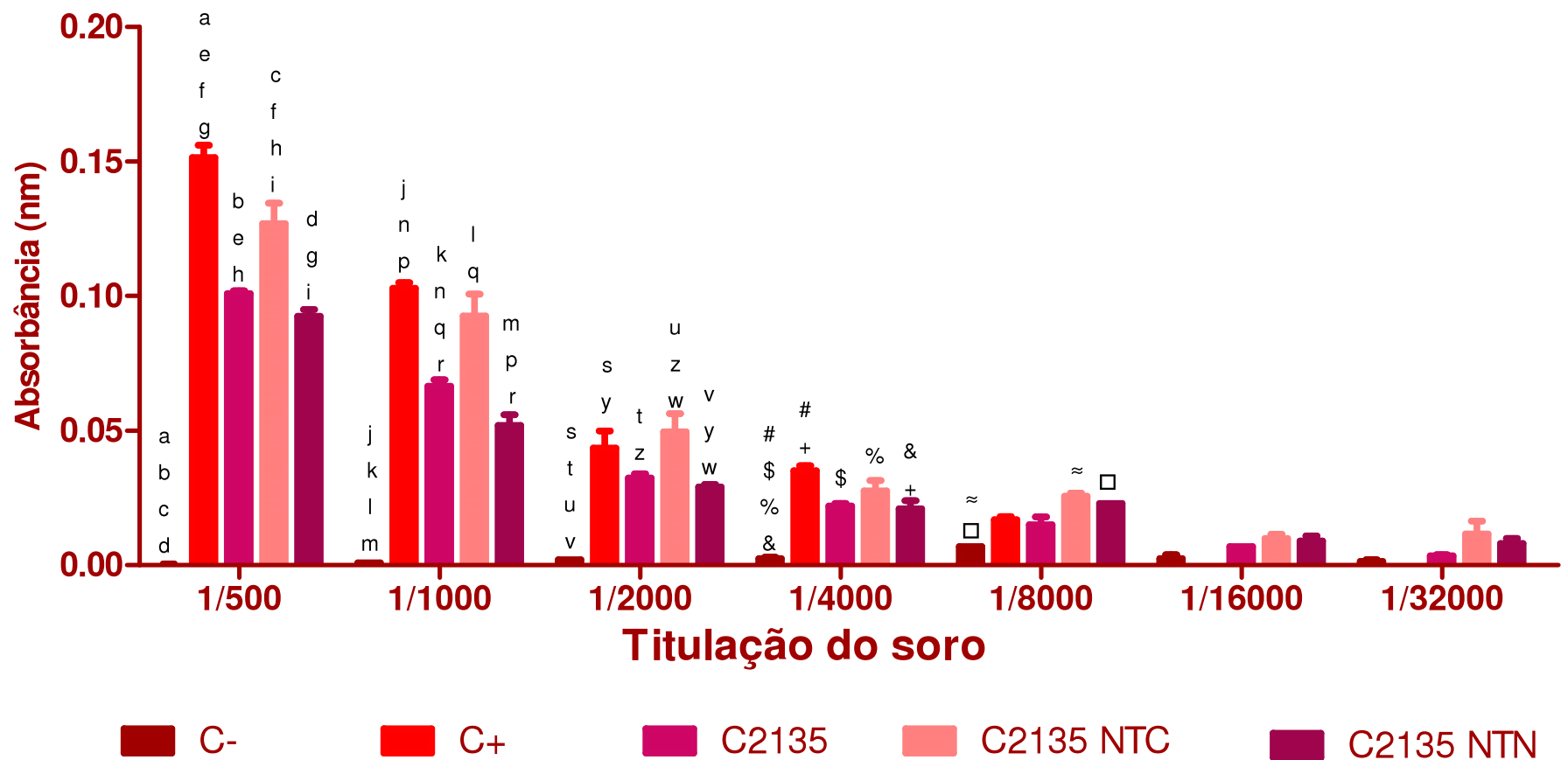


Figura 8: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem B4. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

A análise da resposta imune dos animais tratados com as vacinas utilizando OMVs oriundas de *N. meningitidis* da linhagem C2135 contra a linhagem W135 está representada na Figura 9. O soro desses animais foi testado contra uma linhagem que apresenta um tipo capsular diferente do tipo das cepas progenitoras das OMVs que foram utilizadas para a produção das vacinas.

Os dados mostram que não há uma diferença consistente entre os tratamentos. Há inclusive certa similaridade entre os valores obtidos pelo controle positivo e os demais tratamentos.

É possível perceber que os valores de absorvância obtidos por esse tratamento foram, em média, maiores, quando comparados aos dois últimos ensaios, e próximos, quando comparados ao primeiro. Esse valor mais elevado de absorvância está intimamente ligado à quantidade de anticorpos secundários que conseguiu fazer a ligação com os anticorpos encontrados no soro, que por sua vez conseguiu uma melhor ancoragem nos meningococos da linhagem W135.

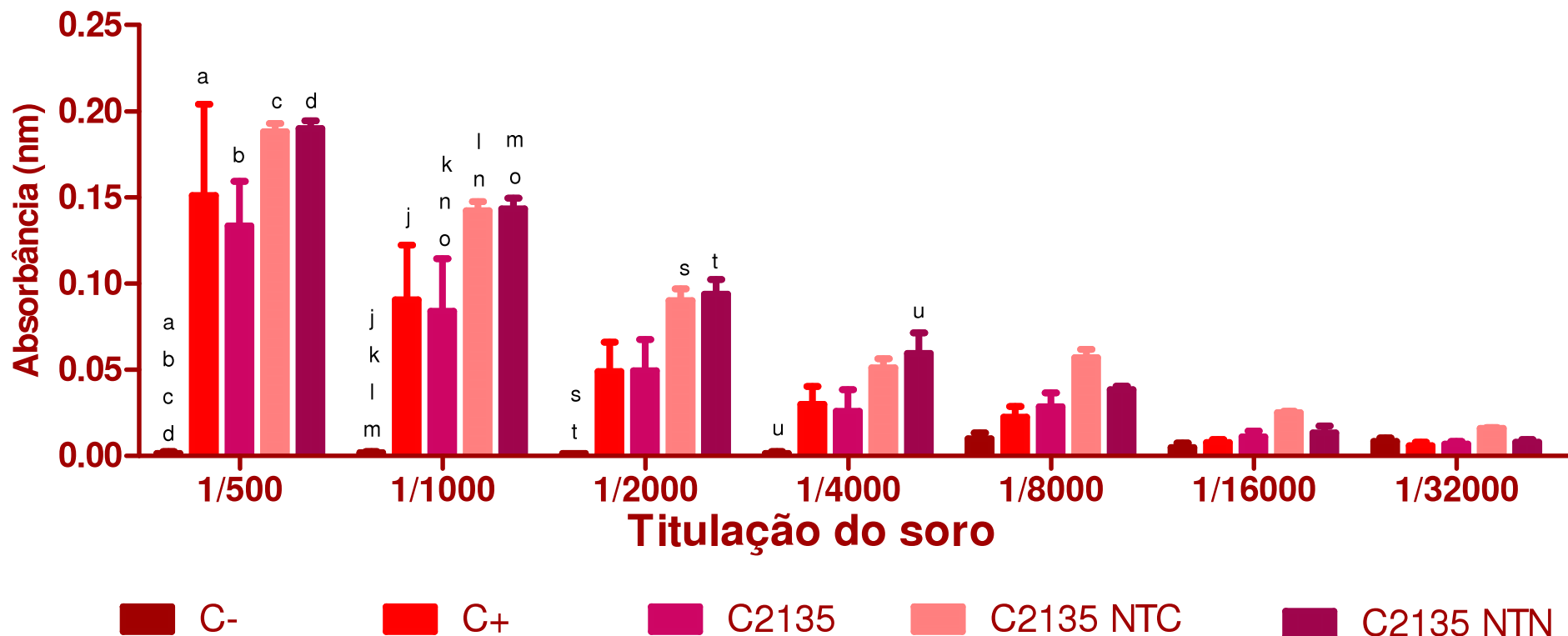


Figura 9: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem W135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

Os dados do ELISA dos soros dos animais tratados com as vacinas produzidas com as OMVs de bactérias da linhagem C2135 frente a um outro meningococo do tipo C, estão apresentados na Figura 10.

Os valores dos tratamentos utilizando as vacinas de OMV estão muito abaixo dos valores apresentados na Figura 6, o que atesta a especificidade dessas imunizações. É possível observar uma ligeira diminuição nos valores obtidos pelo soro dos animais tratados com o NTN, quando comparados com os valores obtidos pelo soro dos tratados com as duas outras vacinas. Não há disponível na literatura qualquer referência que possa identificar a razão para esse fenômeno.

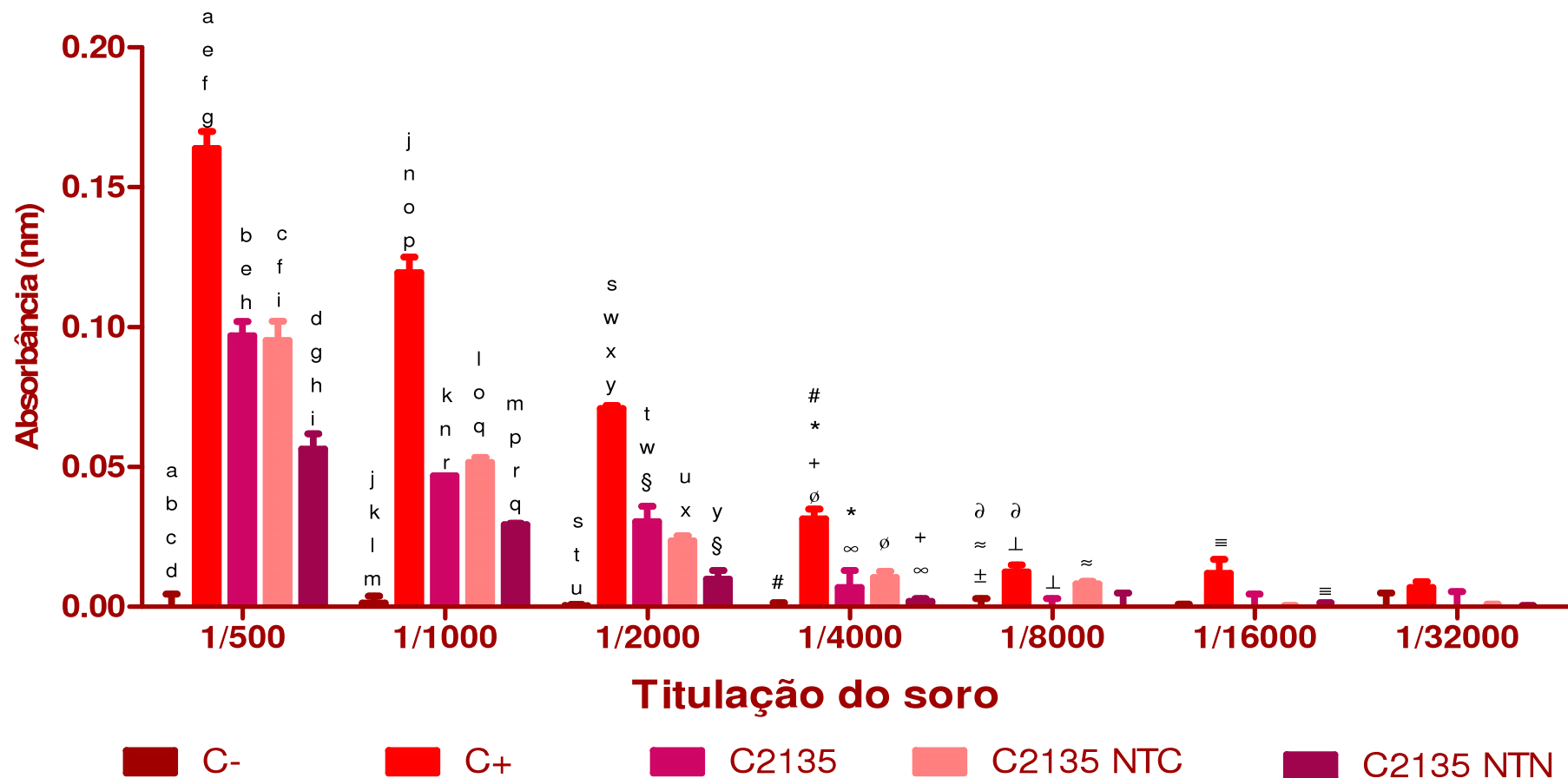


Figura 10: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* C2135 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem P2143. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

Análise da Resposta Imune Utilizando Vacinas de OMVs Provenientes da Linhagem IAL 2443

A Figura 11 apresenta os dados obtidos pela análise de ELISA do soro dos animais imunizados com as vacinas produzidas com OMVs oriundas de *N. meningitidis* da linhagem IAL 2443 e das vacinas de OMV IAL 2443+NTC e OMV IAL 2443+NTN. O soro dos animais foi testado contra a própria IAL 2443. De modo semelhante ao que aconteceu nos testes das imunizações com as vacinas de OMV C2135, a resposta imune foi bastante elevada. Na maioria das diluições o soro dos animais tratados com a vacina contendo apenas a OMV IAL 2443 apresentou um aumento significativo em relação ao controle positivo. Esses resultados confirmam o caráter específico que essas vacinas têm apresentado.

Mais uma vez, como visto na maioria dos tratamentos já apresentados, as nanoestruturas não apresentaram características de adjuvantes. Em algumas diluições, a resposta imune dos animais tratados tanto com a OMV IAL 2443+NTC quanto com a OMV IAL 2443+NTN apresentaram uma sensível diminuição, quando comparadas aos dados obtidos pelos animais tratados com a vacina contendo somente OMV IAL 2443. A análise dos dados da vacina utilizando o NTC como adjuvante é diferente de qualquer outro aqui apresentado. Nos ensaios de ELISA anteriores não foi possível observar esse tipo de tratamento influenciando a diminuição significativa da resposta imune, em relação ao tratamento com a vacina contendo apenas a OMV IAL 2443. Assim é possível afirmar que, nas condições em que os experimentos foram realizados, as nanoestruturas não conseguiram atuar como adjuvante. Elas inclusive geraram uma diminuição na resposta imune dos animais que passaram por esse tratamento.

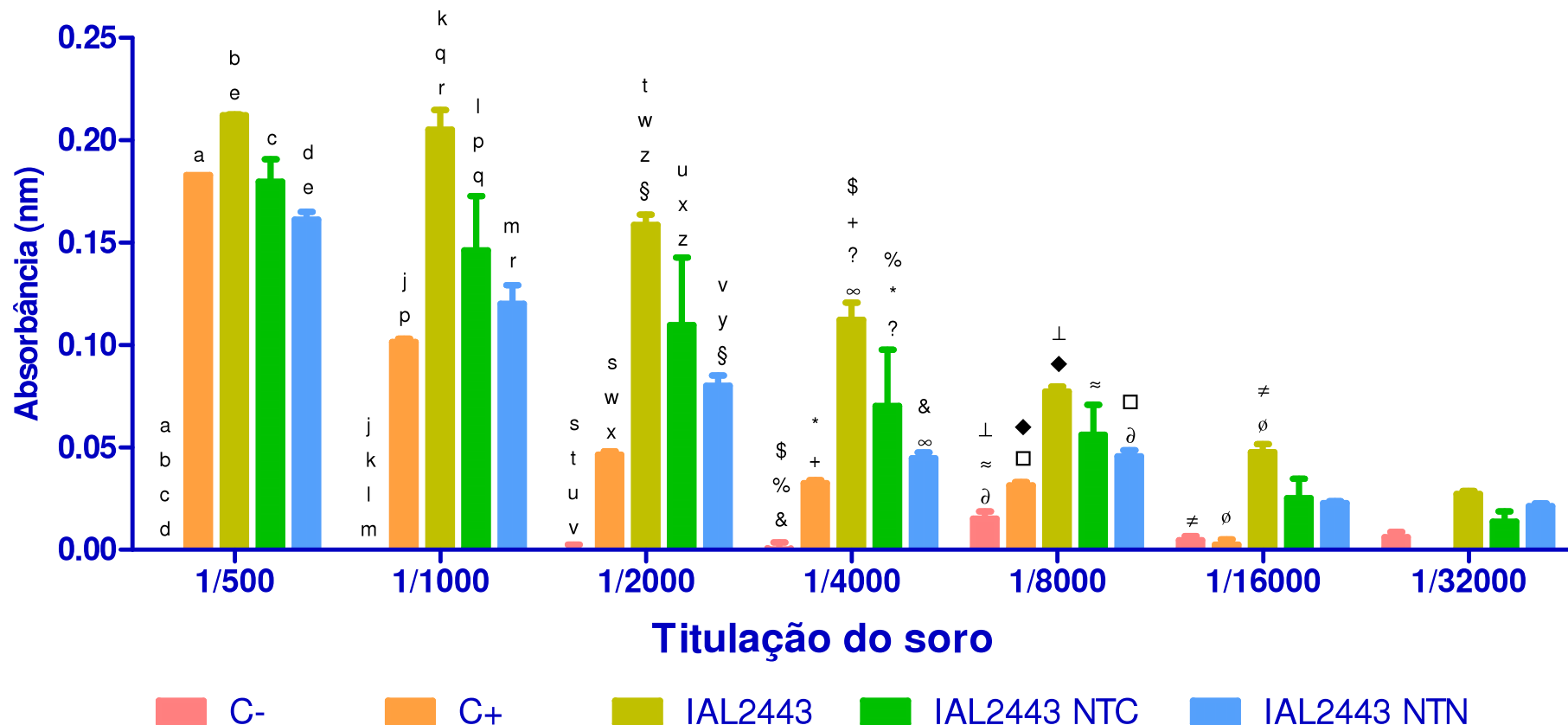


Figura 11: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da mesma linhagem. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

A análise da resposta imune do soro dos animais tratados com as OMVs obtidas a partir da linhagem IAL 2443 contra um *coating* bacteriano da linhagem C2135 está representada na Figura 12.

Os resultados obtidos atestam novamente a especificidade das vacinas. Os dados de absorbância são sensivelmente menores que os dados obtidos pelo ensaio visto na Figura 11. Não há, mais uma vez, qualquer indício que, nas condições as quais os experimentos foram realizados, as nanoestruturas atuem como adjuvantes vacinais.

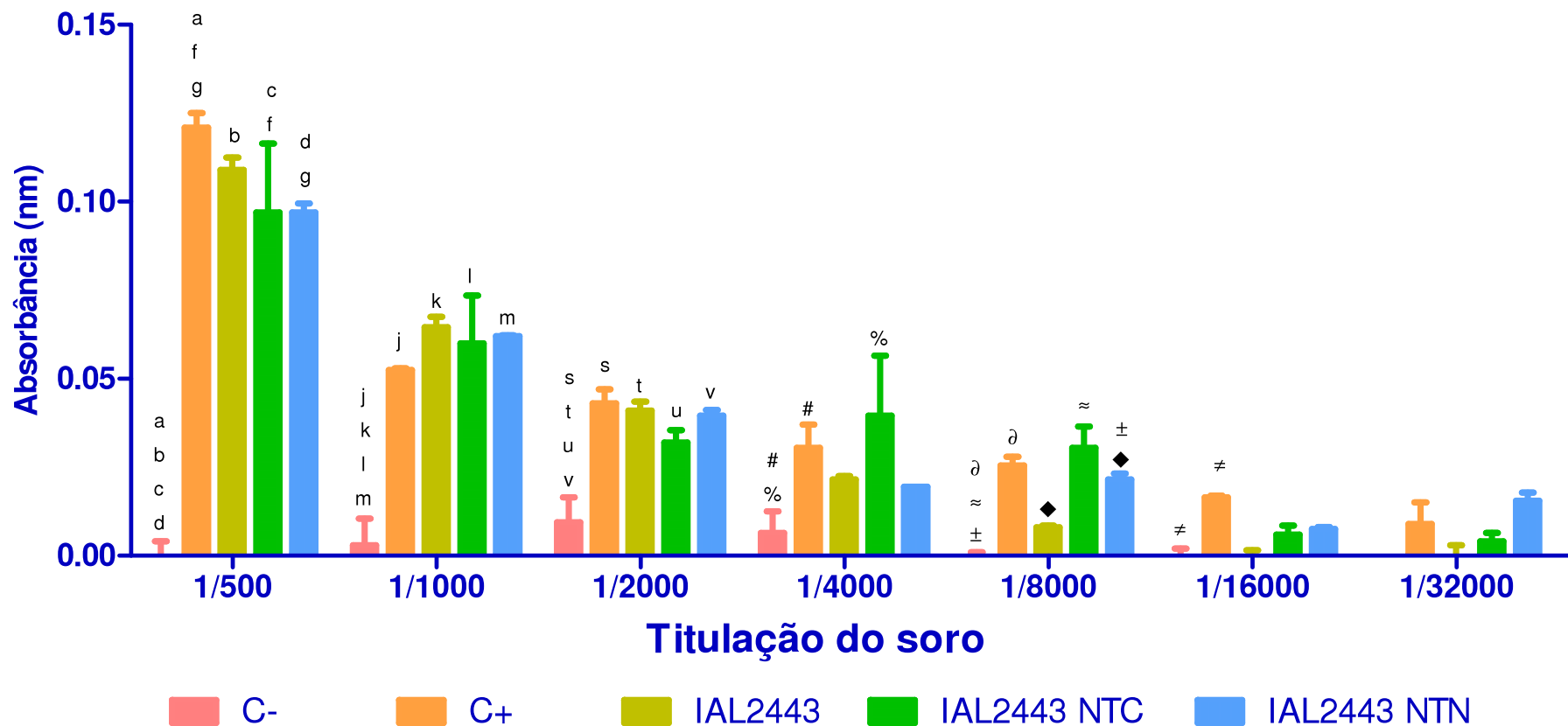


Figura 12: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem C2135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

A análise de ELISA utilizando o soro dos mesmos animais tratados no experimento anterior foi realizada contra a linhagem B4 do meningococo (Figura 13). Apesar de ser contra o *coating* de uma bactéria que possui uma linhagem semelhante à do microrganismo que originou a OMV utilizada na vacina, houve uma diminuição na resposta imune dos animais tratados. Através desses dados é possível inferir que a resposta imune dos animais vacinados está pouco relacionada com o tipo capsular das bactérias em questão.

As nanoestruturas não apresentaram características de adjuvantes vacinais, porém dessa vez não foi observada a influência negativa do grafeno na imunização dos animais. Houve um comportamento semelhante nos três tratamentos.

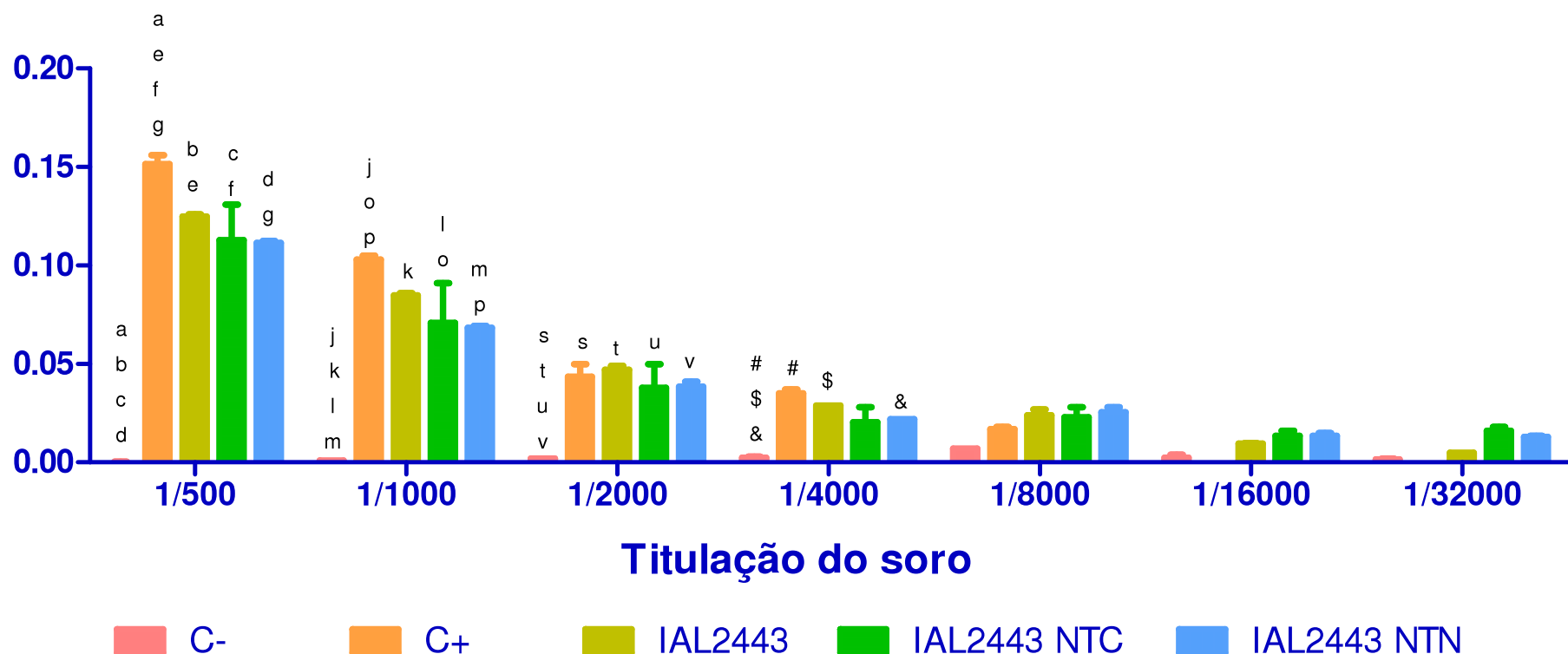


Figura 13: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem B4. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

A análise da resposta imune das vacinas utilizando OMVs oriundas de *N. meningitidis* da linhagem IAL 2443 contra a linhagem W135 (Figura 14) mostra uma aproximação nos valores obtidos nestes tratamentos, quando comparados ao controle positivo. Essa aproximação mostra que não há diferença significativa entre a utilização de qualquer uma das vacinas, fato esse que indica que, nas condições em que os experimentos foram realizados, não houve resultado satisfatório para a confirmação de que as nanoestruturas estudadas possam ser consideradas adjuvantes.

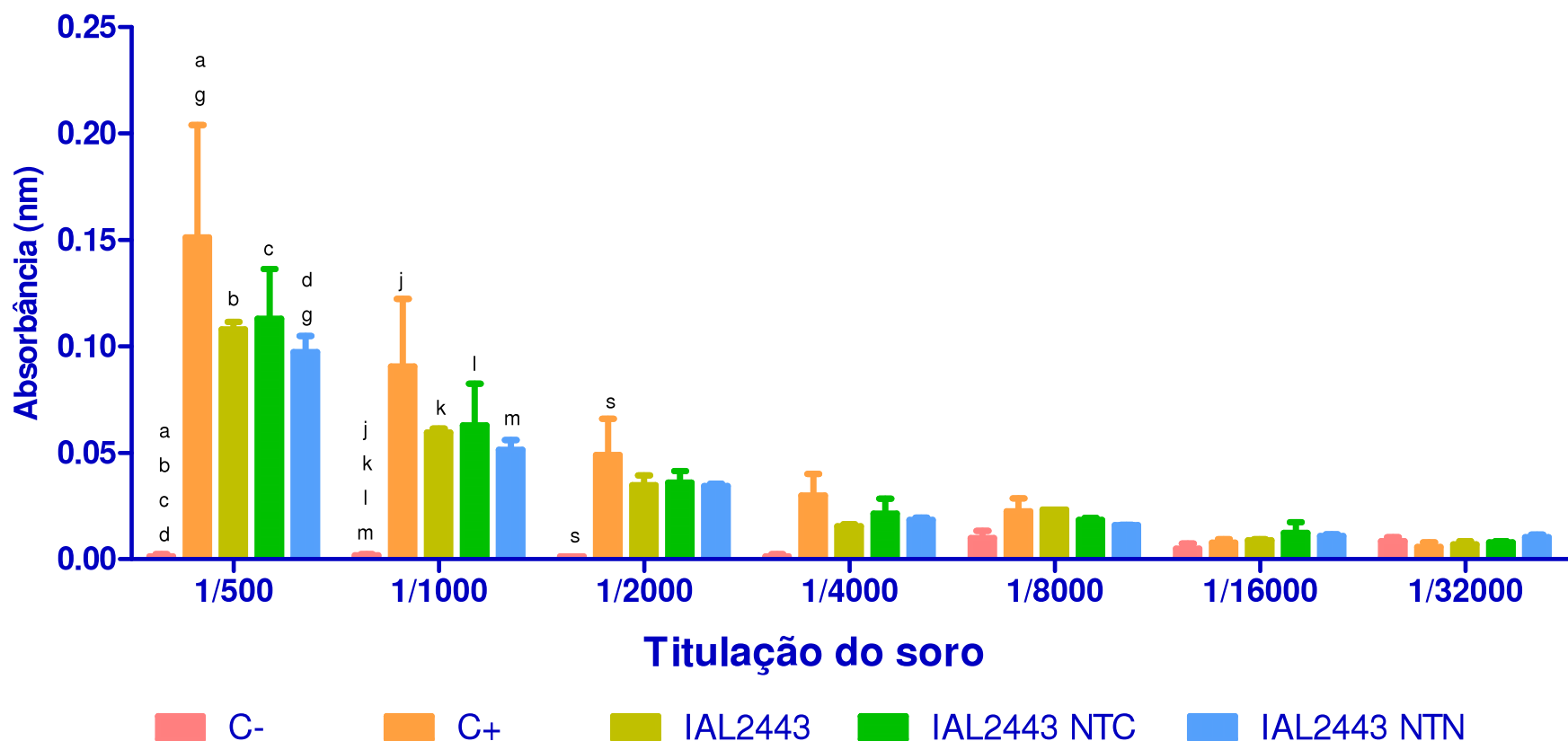


Figura 14: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem W135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

A análise da resposta imune do soro dos animais tratados com as vacinas utilizando OMVs oriundas de *N. meningitidis* da linhagem IAL 2443 contra a linhagem P2143, uma bactéria da do tipo C (Figura 15). Neste caso é possível observar que a vacina produzida com OMV IAL 2443+NTC induziu uma resposta significativamente inferior tanto em relação ao soro do animal tratado com a vacina contendo apenas OMV IAL 2443. Esse resultado é, de certa forma, similar ao resultado obtido no ensaio que foi representado na Figura 11. A resposta para o mesmo soro aqui testado, contra um *coating* bacteriano diferente, naquele caso era contra meningococos da linhagem IAL 2443, também apresentou resultados abaixo dos obtidos pelos animais tratados com a vacina contendo apenas a OMV.

A razão para esses resultados é desconhecida, uma vez que não há referências bibliográficas que possam embasar uma explicação. Uma possibilidade é que esses nanotubos tenham interagido de maneira diferenciada com os proteolipossomos, obtidos da bactéria da linhagem IAL 2443, e dificultado o reconhecimento normal dos anticorpos contra os antígenos presentes na superfície da vesícula.

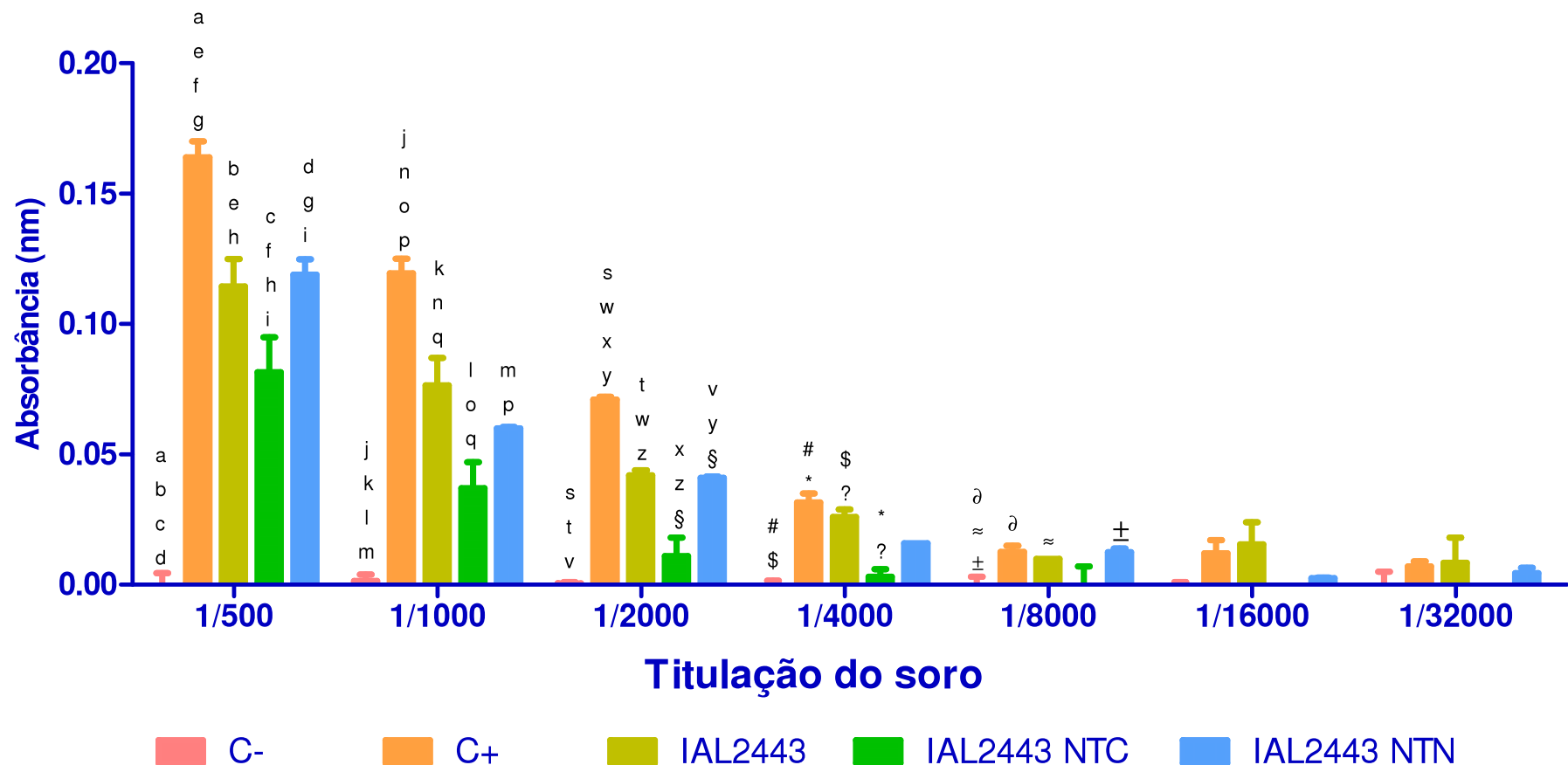


Figura 15: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* IAL 2443 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem P2143. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

Análise da Resposta Imune Utilizando Vacinas de OMVs Provenientes da Linhagem B4

As vacinas preparadas utilizando a OMV B4 como antígeno foram analisadas pelo teste de ELISA. Na Figura 16, em que o ensaio foi realizado contra um *coating* bacteriano do próprio meningococo da linhagem B4, é possível observar que o soro dos animais tratados apenas com a OMV B4 produziu uma resposta imune mais significativa que o controle positivo. Esses dados atestam novamente a especificidade que esse tipo de vacina possui.

Os experimentos, nas condições em que foram desenvolvidos, indicaram mais uma vez a baixa capacidade adjuvante que as nanoestruturas de carbono possuem. No caso do soro dos animais tratados com OMV B4+NTN a resposta imune foi sensivelmente menor nas quatro primeiras diluições, o que pode indicar que, em alguns casos, o grafeno pode dificultar o reconhecimento dos antígenos pelas células do sistema imune.

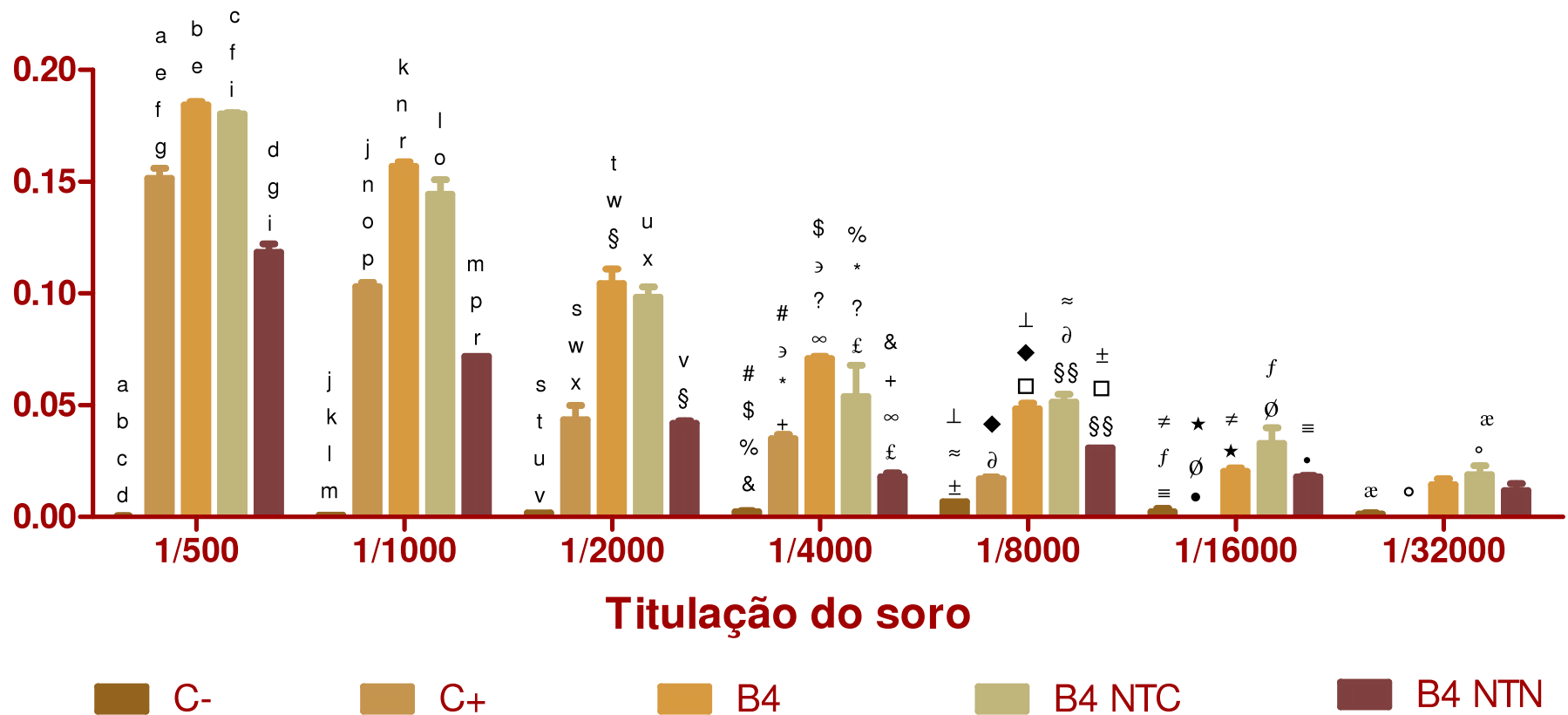


Figura 16: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da mesma linhagem. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

É possível observar na Figura 17 os dados do teste de ELISA contra os meningococos da linhagem C2135. Os valores de absorbância obtidos pelos anticorpos secundários que se ligaram aos anticorpos contidos no soro dos animais tratados com as vacinas de OMV foram muito abaixo dos valores obtidos no ensaio anterior e em todos os demais apresentados anteriormente. A razão para esse baixo valor de absorbância não é muito bem conhecida, pela falta de uma referência que possa explicar tal fato.

Apesar do baixo valor, ainda é possível notar que as nanoestruturas não agem de forma a produzir um aumento na resposta imune. Também é possível perceber que, em alguns casos, o soro dos animais tratados com OMV B4+NTN induz uma diminuição no reconhecimento das células do sistema imune para com os antígenos presentes na vesícula de membrana externa.

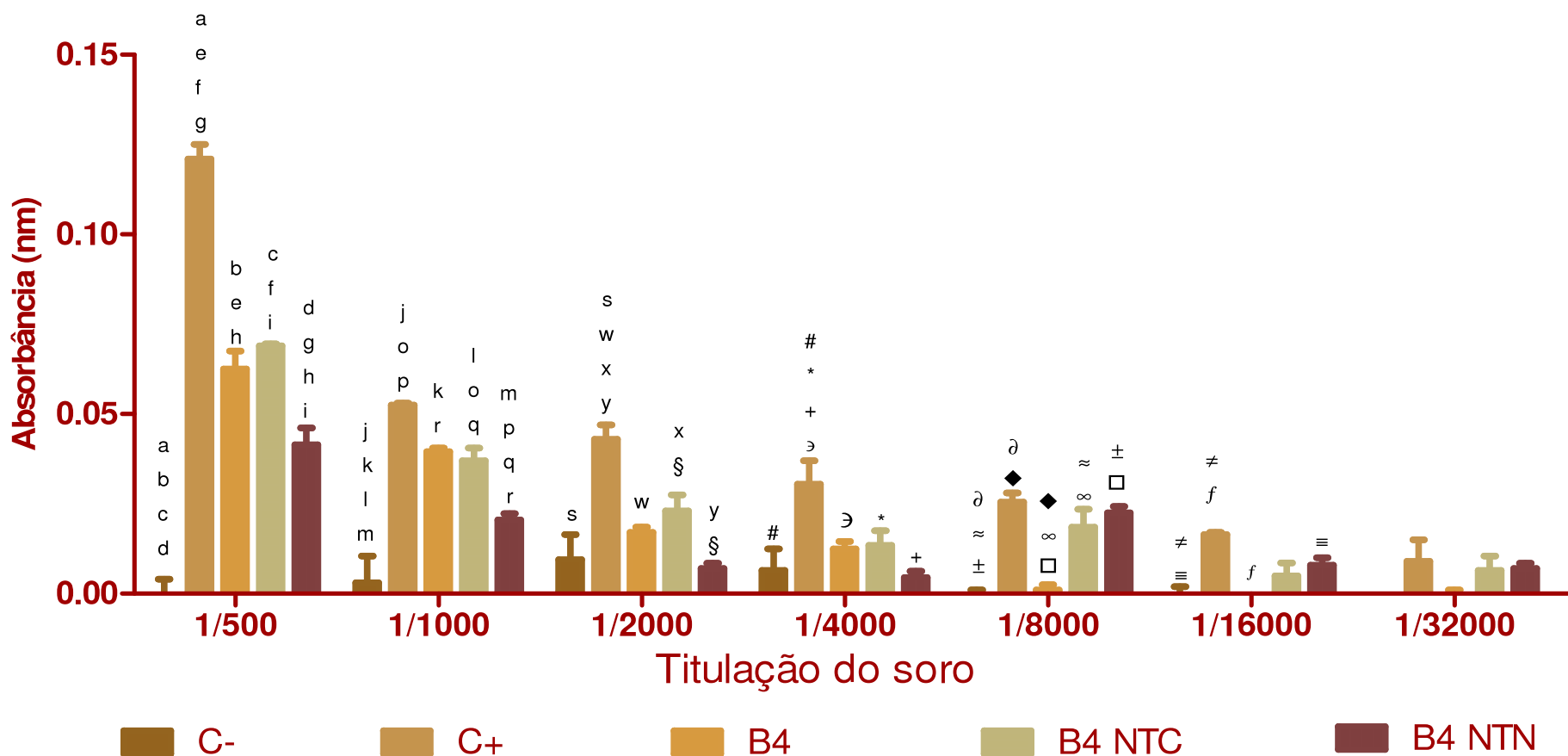


Figura 17: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem C2135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

As análises das respostas imunes das vacinas utilizando OMVs oriundas de *N. meningitidis* da linhagem B4 contra a linhagem IAL 2443 (Figura 18), contra a linhagem W135 (Figura 29) e contra a P2143 (Figura 20) demonstraram, em todos os casos, um baixo valor de absorbância nesses tratamentos, quando comparados com os respectivos controles positivos. Essa peculiaridade, semelhante à observada na Figura 17, é de difícil explicação pela falta de trabalhos que possam servir como base para a elaboração de uma hipótese.

Nos três casos, os experimentos realizados indicaram uma baixa ação adjuvante das nanoestruturas de carbono utilizadas.

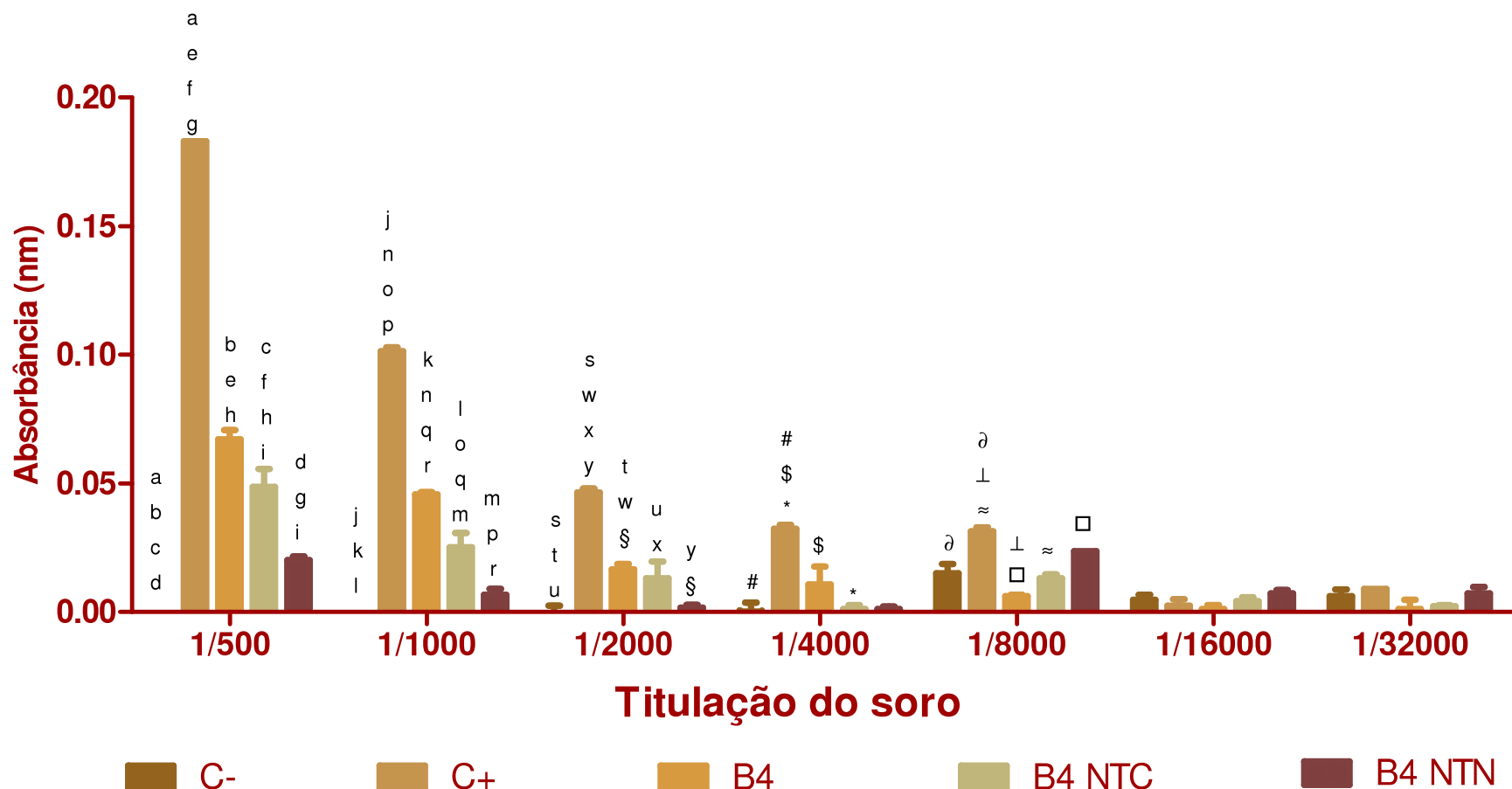


Figura 18: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem IAL 2443. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

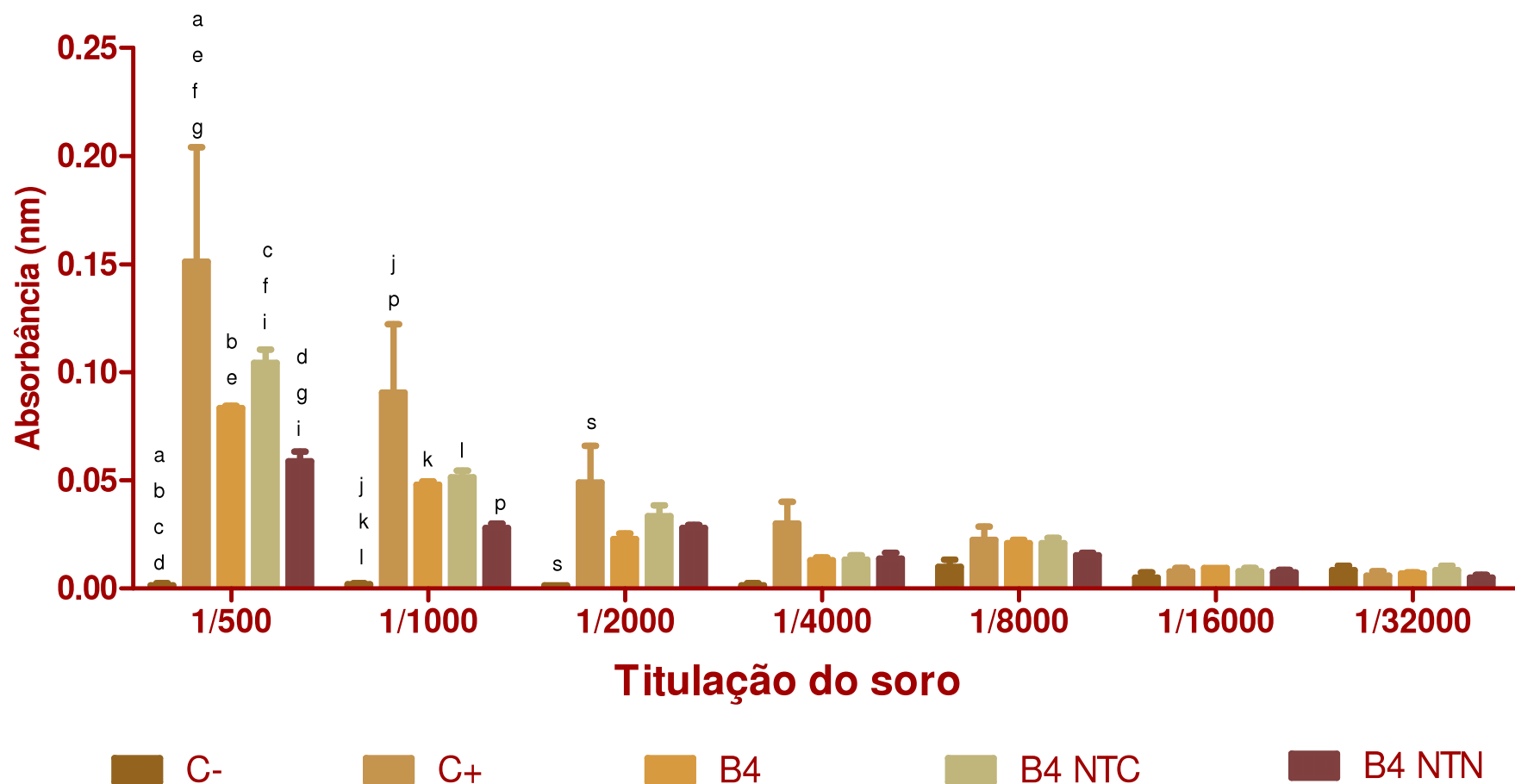


Figura 19: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem W135. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

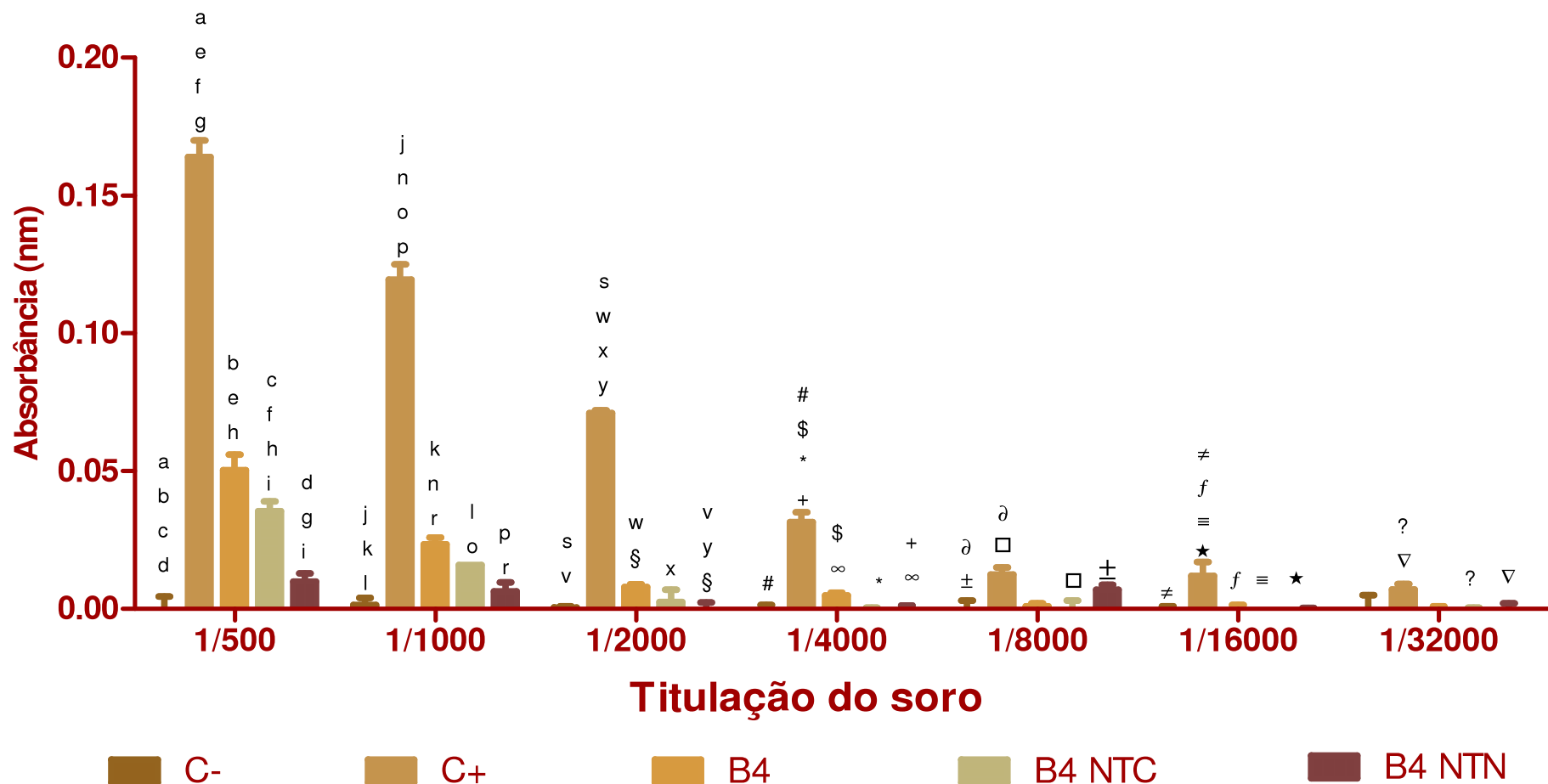


Figura 20: Análise da metodologia de ELISA da resposta imune dos camundongos pela vacinação utilizando OMVs oriundas da linhagem de *N. meningitidis* B4 e associação da mesma com nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) contra *coating* da linhagem P2143. Valores expressos em média $\pm$ epm. C+ (controle positivo - foi utilizado soro humano, do mesmo voluntário, contendo anticorpos para a bactéria), C2135 (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis*), C2135 NTC (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTC) e C2135 NTN (soro do camundongo imunizado com OMV da cepa C2135 de *N. meningitidis* associado ao nanotubo de carbono – NTN). Letras e símbolos iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$; $n = 3$).

Em linhas gerais, a utilização das nanoestruturas de carbono, mais especificamente nanotubos de carbono multilamelares e grafenos, como adjuvantes vacinais nas vacinas meningocócicas é um fato inédito na literatura científica vacinal. Nas condições em que os experimentos foram realizados, os resultados obtidos não conseguem justificar a utilização destes compostos como adjuvantes, diferentemente do que aconteceu com as nanoestruturas de sílica mesoporosa SBA-15 e SBA-16, que foi um trabalho desenvolvido pelo grupo, no qual mostraram um adjuvante promissor para as vacinas protolipídicas contra *N. meningitidis* (Alves D. A., 2012, Dissertação de Mestrado).

Os resultados obtidos indicam que existe uma elevada especificidade nas vacinas de OMV produzidas pelo grupo. Em diversos trabalhos OMVs recombinantes ou proteínas purificadas recombinantes, como a porina, são utilizados para aumentar a abrangência da vacina e evitar a variabilidade das porinas dominantes (Niebla *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2002; Vipond *et al.*, 2006). Por essa razão, a utilização de uma vacina contendo uma preparação de mais de um tipo de OMV pode ser extremamente eficaz, uma vez que a sua proteção poderia abranger mais tipos de meningococos.

A única formulação vacinal capaz de controlar um surto epidêmico de doenças meningocócicas causadas por *N. meningitidis* do sorogrupo B são as vacinas baseadas em OMVs (Marzoa *et al.* 2012) e é por essa razão que o desenvolvimento desse tipo vacina e a elaboração de alternativas para a produção da mesma se faz tão necessário.

CONCLUSÕES

O processo desenvolvido pelo grupo para extração de OMVs, através da ultrafiltração, mostrou-se eficaz, porém as diferenças entre as linhagens devem ser levadas em consideração para obter melhores resultados.

O teste de hepatotoxicidade não indicou que as nanoestruturas de carbono (NTC e NTN) ou as vesículas produzidas possam ser tóxicas ao fígado dos animais tratados.

Nas condições em que os testes foram realizados, não houve a confirmação a partir dos resultados obtidos de que as nanoestruturas de carbono possuem capacidade adjuvante.

A análise do ensaio de ELISA mostrou que as vacinas de OMVs produzidas apresentaram uma alta especificidade. Elas responderam melhor que o controle positivo quando testadas contra as bactérias que deram origem as suas OMVs constituintes. Quando o teste era feito contra bactérias de outras linhagens, a resposta imune era menor do que quando comparados com a resposta do soro humano imunizado por vacinas amplamente utilizadas.

DESAFIOS FUTUROS

A caracterização da associação OMV + nanoestruturas de carbono, pela utilização de métodos como a análise do potencial zeta e o espalhamento de luz, se faz fundamentalmente necessário para o desenvolvimento de uma hipótese que possa explicar as diferentes respostas imunes obtidas pela análise do ensaio de ELISA.

A preparação de uma vacina contendo vesículas de membrana externa oriundas de diversos tipos de linhagens seria uma ótima fonte de comparação para os resultados obtidos nesse trabalho.

É necessário realizar uma comparação mais efetiva entre o método de extração desenvolvido e os demais métodos que existem na literatura para confirmar a capacidade da técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achtman M. Population structure of pathogenic bacteria revisited. *Int J Med Microbiol.* Sep;294(2-3):67-73, 2004.
- Alves, D. A. Utilização de sílica mesoporosa como adjuvante em vacinas de vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis*. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- Baehr W, Gotschlich EC, Hitchcock PJ. The virulence-associated gonococcal H.8 gene encodes 14 tandemly repeated pentapeptides. *Mol Microbiol.* Jan;3(1):49-55, 1989.
- Bakir M, Yagci A, Ulger N, Akbenlioglu C, Ilki A, Soyletir G. 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(11):1015-8, 2001.
- Bart A, Barnabé C, Achtman M, Dankert J, van der Ende A, Tibayrenc M. The population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A fits the predictions for clonality. *Infect Genet Evol.* Dec;1(2):117-22, 2001.
- Bennett DE, Mulhall RM, Cafferkey MT. PCR-based assay for detection of *Neisseria meningitidis* capsular serogroups 29E, X, and Z. *J Clin Microbiol.* Apr;42(4):1764-5, 2004.
- Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S, Llobès R. *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol.* Sep;180(18):4872-8, 1998.
- Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity. *Vaccine.* Mar 18;23(17-18):2222-7, 2005.
- Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, Martinez M, Arthur J, Underwood P, Silva W, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3)

outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. Vaccine. Jun;13(9):821-9, 1995.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. May 7;72:248-54, 1976.

Brandtzaeg P. The role of humoral mucosal immunity in the induction and maintenance of chronic airway infections. Am J Respir Crit Care Med. Jun;151(6):2081-6; discussion 2086-7, 1995.

Cascales E, Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Lloubes R. Pal lipoprotein of Escherichia coli plays a major role in outer membrane integrity. J Bacteriol. Feb;184(3):754-9, 2002.

Caugant DA, Høiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, Wedege E, Eng J, Frøholm LO. Asymptomatic carriage of Neisseria meningitidis in a randomly sampled population. Journal of Clinical Microbiology. n. 32, v. 2, p. 323–30, 1994.

Caugant DA, Høiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, Wedege E, Eng J, Frøholm LO. Asymptomatic carriage of Neisseria meningitidis in a randomly sampled population. J Clin Microbiol. Feb;32(2):323-30, 1994.

Chanteau S, Rose AM, Djibo S, Nato F, Boisier P. Biological diagnosis of meningococcal meningitis in the African meningitis belt: current epidemic strategy and new perspectives. Vaccine. Sep 3;25 Suppl 1:A30-6, 2007.

Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, Borsboom D, van der Ark A, van Straaten I, Roholl P, Kuipers B, Poolman J. Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. Vaccine. Jul;14(10):1001-8, 1996.

Cohen-Tanugi D. & Grossman J. C. Water Desalination across Nanoporous Graphene. Nano. Lett. 12; 7: 3602–3608. 2012.

Collins CL, Pollard AJ. Meningococcal vaccines. *Curr Opin Investig Drugs*. Jul;3(7):975-9, 2002.

Comanducci M, Bambini S, Brunelli B, Adu-Bobie J, Aricò B, Capecchi B, Giuliani MM, Masignani V, Santini L, Savino S, Granoff DM, Caugant DA, Pizza M, Rappuoli R, Mora M. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med*. Jun 3;195(11):1445-54, 2002.

Cox FR, Cox ME, Martin JR, Stoer UH. Radiometric detection of carbohydrate catabolism by pathogenic *Neisseria*. *J Clin Microbiol*. Sep;6(3):310-1, 1977.

Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. Feb;15(3):248-56, 1997.

Crowley CL, Payne CM, Bernstein H, Bernstein C, Roe D. The NAD⁺ precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by a multiple stress inducer, deoxycholate. *Cell Death Differ*. Mar;7(3):314-26, 2000.

de Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, Landgraf IM, Gattas VL, Vasconcelos Hde G, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet*. Oct 31;340(8827):1074-8, 1992.

de Vries FP, van Der Ende A, van Putten JP, Dankert J. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infect Immun*. Aug;64(8):2998-3006, 1996.

DeVoe IW. The meningococcus and mechanisms of pathogenicity. *Microbiol Rev*. Jun;46(2):162-90, 1982.

Dos Santos, F. L. Avaliação da qualidade e potencial atividade adjuvante do lipídio A de *Bordetella pertussis*. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Dudu V, Rotari V, Vazquez M. Sendai virus-based liposomes enable targeted cytosolic delivery of nanoparticles in brain tumor-derived cells. *J Nanobiotechnology*. Feb 17;10:9, 2012.

Etienne J, Sperber G, Adamou A, Picq JJ. Epidemiological notes: meningococcal meningitis of serogroup X in Niamey (Niger). *Med Trop (Mars)*. Apr;50(2):227-9, 1990.

Farboud ES, Nasrollahi SA, Tabbakhi Z. Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *Int J Nanomedicine*. 6:611-7, 2011.

Frackowiak E. & Béguin F. Electrochemical storage of energy in carbon nanotubes and nano-structured carbons. *Carbon*. 40: 1775–1787. 2002.

Frasch CE, Sacchi CT, Brandiolone MC, Vieira VS, Leite LC. Development of a second generation group B meningococcal vaccine. *NIPH Ann*. Dec;14(2):225-30; discussion 230-1, 1991.

Frasch CE. Status of a group B *Neisseria meningitidis* vaccine. *Eur J Clin Microbiol*. Dec;4(6):533-6, 1985.

Frosch M, Edwards U, Bousset K, Krausse B, Weisgerber C. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol Microbiol*. May;5(5):1251-63, 1991.

Harrison LH, Jolley KA, Shutt KA, Marsh JW, O'Leary M, Sanza LT, Maiden MC; Maryland Emerging Infections Program. Antigenic shift and increased incidence of meningococcal disease. *J Infect Dis*. May 1;193(9):1266-74. Epub 2006 Mar 28, 2006.

Henry T, Pommier S, Journet L, Bernadac A, Gorvel JP, Llobès R. Improved methods for producing outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Res Microbiol*. Jul-Aug;155(6):437-46, 2004.

Hitchcock PJ, Leive L, Mäkelä PH, Rietschel ET, Strittmatter W, Morrison DC. Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *J Bacteriol*. Jun;166(3):699-705, 1986.

Hollanda LM, Cury GC, Pereira RF, Ferreira GA, Sousa A, Sousa EM, Lancellotti M. Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnology*. Jul 25;9:28, 2011.

Hussey G, Schaaf H, Hanslo D, Hitchcock J, Coetzee G, Pitout J, Malan H, Donald P. Epidemiology of post-neonatal bacterial meningitis in Cape Town children. *S Afr Med J*. Jan;87(1):51-6, 1997.

Jódar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet*. Apr 27;359(9316):1499-508, 2002.

Jodar L, Stephens D, Feavers IM. Assay parameters and methods of data analysis for the comparison of complement sources in the *Neisseria meningitidis* serogroup C serum bactericidal assay. *Biologicals*. Dec;30(4):323-9, 2002.

Kam N. W. S., O'Connell M., Wisdom J. A. & Dai H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *PNAS*. 33; 102. 2005.

Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*. Nov 15;19(22):2645-55, 2005.

Lancellotti M, Guiyoule A, Ruckly C, Hong E, Alonso JM, Taha MK. Conserved virulence of C to B capsule switched *Neisseria meningitidis* clinical isolates belonging to ET-37/ST-11 clonal complex. *Microbes Infect*. Jan;8(1):191-6, 2006.

Lima TZ, Blanco MM, Santos Júnior JG, Coelho CT, Mello LE. Staying at the crossroads: assessment of the potential of serum lithium monitoring in predicting an ideal lithium dose. *Rev Bras Psiquiatr*. Sep;30(3):215-21, 2008.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable

approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 17;95(6):3140-5, 1998.

Marzoa J, Sánchez S, Costoya L, Diéguez-Casal E, Freixeiro P, Brookes C, Allen L, Taylor S, Gorringe AR, Ferreirós CM & Criado MT. Induction of immune responses by purified outer membrane protein complexes from *Neisseria meningitides*. *Vaccine* 30: 2387–2395. 2012.

Mattos IB, Alves DA, Hollanda LM, Ceragiogli HJ, Baranauskas V, Lancellotti M. Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process. *J Nanobiotechnology*. Nov 16;9:53, 2011.

McBroom AJ, Johnson AP, Vemulapalli S, Kuehn MJ. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol*. Aug;188(15):5385-92, 2006.

Milagres LG, Gorla MC, Sacchi CT, Rodrigues MM. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. *Infect Immun*. Oct;66(10):4755-61, 1998.

Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT, Melles CE, Vieira VS, Sato H, Brito GS, Moraes JC, Frasch CE. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun*. Oct;62(10):4419-24, 1994.

Morley SL, Cole MJ, Ison CA, Camaraza MA, Sotolongo F, Anwar N, Cuevas I, Carbonero M, Campa HC, Sierra G, Levin M. Immunogenicity of a serogroup B meningococcal vaccine against multiple *Neisseria meningitidis* strains in infants. *Pediatr Infect Dis J*. Nov;20(11):1054-61, 2001.

Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine*. Dec 12;20(5-6):666-87, 2001.

Nasir A. Nanotechnology in vaccine development: a step forward. *J Invest Dermatol*. May;129(5):1055-9, 2009.

Niebla O., Alvarez A., Martín A., Rodríguez A., Delgado M., Falcón V. Immunogenicity of recombinant class 1 protein from *Neisseria meningitidis* refolded in phospholipid vesicles and detergent. *Vaccine*. 19: 3568–74. 2001

Noronha CP, Struchiner CJ, Halloran ME. Assessment of the direct effectiveness of BC meningococcal vaccine in Rio de Janeiro, Brazil: a case-control study. *Int J Epidemiol*. Oct;24(5):1050-7, 1995.

Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*. Apr;11(4 Suppl):S63-8, 2005.

Peeters CC, Claassen IJ, Schuller M, Kersten GF, van der Voort EM, Poolman JT. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* in mice. *Vaccine*. Jun 4;17(20-21):2702-12, 1999.

Pollard AJ, Scheifele D. Meningococcal disease and vaccination in North America. *J Paediatr Child Health*. Oct;37(5):S20-7, 2001.

Quintilio W, Kubrusly FS, Iourtov D, Miyaki C, Sakauchi MA, Lúcio F, Dias Sde C, Takata CS, Miyaji EN, Higashi HG, Leite LC, Raw I. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine*. Jun 24;27(31):4219-24, 2009.

Ruoff R. S. & Lorents D. C. Mechanical and thermal properties of carbon nanotubes. *Carbon*. 33: 925-30.1995.

Sáfadi MA, Barros AP. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combinations. *J Pediatr (Rio J)*. Jul;82(3 Suppl):S35-44, 2006.

Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*. Aug;12(4):456-63, 2000.

Sulahian A., Tabouret M., Ribaud P., Sarfati J., Gluckman E. & Latge´ J. P. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 15: 139 – 45. 1996.

Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 7;94(1):271-6, 1997.

Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect.* Aug;1(10):777-83, 1999.

Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine.* Jul 16;17(22):2826-9, 1999.

Taha MK, Deghmane AE, Antignac A, Zarantonelli ML, Larribe M, Alonso JM. The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol.* Aug;10(8):376-82, 2002.

Tans S. J., Verschueren A. R. M. & Dekker C. Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube *Nature.* 393: 49-52. 1998.

Terrones M. Science and technology of the twenty-first century: Synthesis, Properties, and Applications of Carbon Nanotubes *Annu. Rev. Mater. Res.* 33:419–501. 2003.

van der Ley P, Steeghs L, Hamstra HJ, ten Hove J, Zomer B, van Alphen L. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect Immun.* Oct;69(10):5981-90, 2001.

van der Ley P, van der Biezen J, Poolman JT. Construction of *Neisseria meningitidis* strains carrying multiple chromosomal copies of the porA gene for use in the production of a multivalent outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine.* Mar;13(4):401-7, 1995.

van der Voort ER, van Dijken H, Kuipers B, van der Biezen J, van der Ley P, Meylis J, Claassen I, Poolman J. Human B- and T-cell responses after immunization with a hexavalent PorA meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun.* Dec;65(12):5184-90, 1997.

Vipond C., Suker J., Jones C., Tang C., Feavers I. M. & Wheeler J. X. Proteomic analysis of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from the group B strain NZ98/254. *Proteomics.* 6:3400–13. 2006.

Williams JN, Skipp PJ, Humphries HE, Christodoulides M, O'Connor CD, Heckels JE. Proteomic analysis of outer membranes and vesicles from wild-type serogroup B *Neisseria meningitidis* and a lipopolysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun.* Mar;75(3):1364-72, 2007.

Wong VK, Hitchcock W, Mason WH. Meningococcal infections in children: a review of 100 cases. *Pediatr Infect Dis J.* Apr;8(4):224-7, 1989.

Wright J. C., Williams J. N., Christodoulides M. & Heckels J. E. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 70: 4028–34. 2002.

Zan R., Ramasse Q. M., Bangert U. & Novoselov K. S. Graphene Reknits Its Holes. *Nano Lett.* Article ASAP. 2012.

Zarantonelli ML, Antignac A, Lancellotti M, Guiyoule A, Alonso JM, Taha MK. Immunogenicity of meningococcal PBP2 during natural infection and protective activity of anti-PBP2 antibodies against meningococcal bacteraemia in mice. *J Antimicrob Chemother.* May;57(5):924-30, 2006.

Zhao L, Feng SS. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembranes. *J Colloid Interface Sci.* Jun 1;274(1):55-68, 2004.

Zhou D, Stephens DS, Gibson BW, Engstrom JJ, McAllister CF, Lee FK, Apicella MA. Lipooligosaccharide biosynthesis in pathogenic *Neisseria*. Cloning, identification, and characterization of the phosphoglucomutase gene. *J Biol Chem*. Apr 15;269(15):11162-9, 1994.

Zhou J, Bowler LD, Spratt BG. Interspecies recombination, and phylogenetic distortions, within the glutamine synthetase and shikimate dehydrogenase genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species. *Mol Microbiol*. Feb;23(4):799-812, 1997.

Zollinger WD, Moran EE, Devi SJ, Frasch CE. Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Infect Immun*. Mar;65(3):1053-60, 1997.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Estudo da utilização de nanotubos de carbono como adjuvante em vacinas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da seguinte Comissão:

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 2185-1, Instituição: Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Ives Bernardelli de Mattos
Aluno: Ives Bernardelli de Mattos

Marcelo Lancellotti
Orientador: Marcelo Lancellotti

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

RESEARCH

Open Access

Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process

Ives B Mattos¹, Danilo A Alves¹, Luciana M Hollanda¹, Helder J Ceragiogli², Vitor Baranauskas² and Marcelo Lancellotti^{1*}

Abstract

Background: This study aimed at verifying the action of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under the naturally transformable *Neisseria meningitidis* against two different DNA obtained from isogenic mutants of this microorganism, an important pathogen implicated in the genetic horizontal transfer of DNA, causing the escape of the principal vaccination measured worldwide by the capsular switching process.

Materials and methods: The bacterium receptor strain C2135 was cultivated and had its mutant DNA donor M2 and M6, which received a receptor strain and MWCNT at three different concentrations. The inhibition effect of DNase on the DNA in contact with nanoparticles was evaluated.

Results: The results indicated an increase in the transformation capacity of *N. meningitidis* in different concentrations of MWCNT when compared with negative control without nanotubes. A final analysis of the interaction between DNA and MWCNT was carried out using Raman Spectroscopy.

Conclusion: These increases in the transformation capacity mediated by MWCNT, in meningococci, indicate the interaction of these particles with the virulence acquisition of these bacteria, as well as with the increase in the vaccination escape process.

Introduction

Neisseria meningitidis is a commensal bacterium of the human upper respiratory tract that may occasionally provoke invasive infections such as septicemia and meningitis. It is also naturally competent and therefore can exchange genetic information with each other by this process. This natural competence has been directly correlated to pilliation of these organisms, as well as a specific uptake sequence, within the genome of these bacterium [1].

The use of mutations for the study of the capsular polysaccharide of *N. meningitidis* is the aim of several studies of the meningococci pathogenesis [2-4]. The capsular polysaccharide is the major virulence factor and a protective antigen. Meningococcal strains are

classified into 12 different serogroups according to their capsular immune specificity, along with serogroups A, B, C, Y and W135 are the most frequently found in invasive infections. The capsule of serogroups B, C, Y and W135 strains is composed of either homopolymers (B and C) or heteropolymers (Y and W135) of sialic acid-containing polysaccharides that are specifically linked, depending on the serogroup [5,6]. This polymerization is mediated by the polysialyltransferase, encoded by the *siaD* gene in strains of serogroups B and C (also called *synD* and *synE*, respectively) and by *synG* in serogroup W135. Capsule switching after replacement of *synE*, in a serogroup C strain, by *synG* may result from the conversion of capsule genes by transformation and allelic recombination [7-10]. Such capsule switching from serogroup C to B *N. meningitidis* was observed in several countries, either spontaneously or after vaccination campaigns [7-13]. It might explain the emergence and the clonal expansion of strains of serogroup W135 of

* Correspondence: mlancell@unicamp.br

¹LABIOTEC - Biotechnology Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Biology CP6109, University of Campinas - UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Mattos et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

N. meningitidis in the year 2000 among Hajj pilgrims who had been vaccinated against meningococci of serogroups A and C [14]. These W135 strains belong to the same clonal complex ET-37/ST-11 as prominent serogroup C strains involved in outbreaks worldwide [8,9,15]. Hence, the emergence of these W135 strains in epidemic conditions raised the question about a possible capsule switching as an escape mechanism to vaccine-induced immunity. Also, these events are expected to occur continuously and can be selected by immune response against a particular capsular polysaccharide [9].

However, the interference of immune response with transformation efficacy has not been yet evaluated. Specific capsular antibodies are expected to bind to the bacterial surface and hence they interfere in DNA recognition and uptake. Also, environmental interference under the transformation process of this bacterium is unknown.

This work aimed at the use of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) for the study of the nanostructures action on the transformation process of meningococci, specifically their functions under the capsular switching process. The methods used in this work aimed at the action of MWCNT in the transformation of serogroup C *N. meningitidis* against two different DNA obtained from isogenic mutants of this microorganism.

Methods

Synthesis of multi-walled carbon nanotubes

The carbon nanotubes were produced by the process of hot filament chemical vapor deposition (HFCVD), at the Nanoengineering and Diamond Laboratory (NanoEng) of the Department of Semiconductors, Instruments and Photonics of the UNICAMP School of Electric Engineering and Computer Science. The carbon nanotubes

were made in a copper substrate covered by a conductive polymer film called polyaniline. The polyaniline film covering the copper was dried on a hot plate at 100°C. After that, 0.2 ml of a 2 g/l acetone-diluted nickel nitrate ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) (where the nickel is the catalyzer for the growth of carbon nanotubes) was dropped on the dry polyaniline film. After drying, in room temperature, the polyaniline film was introduced into the HFCVD reactor in nitrogen atmosphere at 450°C and 27 mbar pressure for 30 minutes of growth time. An acetone solution of camphor bubbled in hydrogen gas was used as source of carbon. Morphological analyses were made by FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) using a JEOL JSM-6330F operated at 5 KV, 8 μA , and HRTEM (High Resolution Transmission Electron Microscopy) using a JEOL JSM 3010 operated at 300 KV and 73 μA . Figure 1 shows typical images of FESEM and HRTEM. We also used other nanostructures to confirm our results as the NC nanotubes (commercially obtained from Helix Material Solutions, USA), the NT2 were described by Grecco *et al.* [16].

Bacterial Strains and Media

The characteristics of the strains used in this study are described in Table 1. They were grown at 37°C under 5% of CO_2 on GCB agar medium (Difco) containing the supplements described by Lancellotti *et al.* [9]. When needed, culture media were supplemented with erythromycin at 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and spectomycin at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. *Escherichia coli* strains used for plasmid preparations were DH5 α [17].

DNA Techniques

Recombinant DNA protocols and transformation were performed as described previously [18]. The oligonucleotides used are listed in Table 2. All the mutants

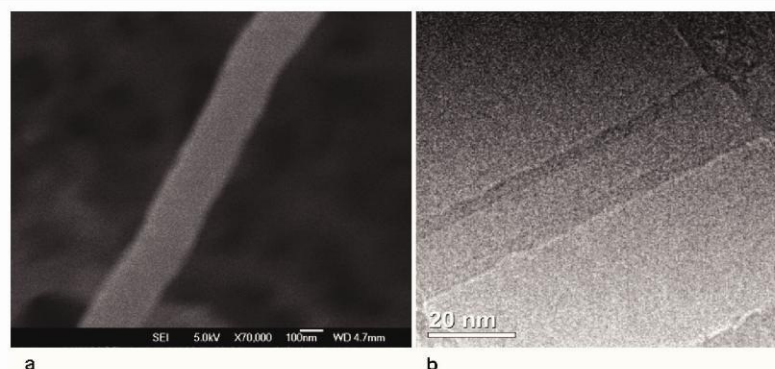


Figure 1 shows (a) the morphologic by SEM and (b) structure by HRTEM of typical as deposited MWCNTs. Scale bars are indicated, the outer diameter is ca. 200 nm and length > 1500 nm for the MWCNT show in (a). Multi-walled structures are presented in (b) corresponding to a MWCNT with outer diameter of ca. 20 nm.

Table 1 Bacterial Strains used in this work

Strain	Characteristics	Origin (Reference)
DH5 α	<i>Escherichia coli</i> F-, endA1, hsdR17 c, supE44, thi-1, gir A96, relA1	[17]
pLAN45	Plasmid containing Δ NMB0065:: <i>QaaDA</i> derived from pGEMTEasy	[18]
pLAN13	Plasmid containing the fusion of <i>synG::ermAM</i>	[18]
C2135	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C, BIOMERIEUX	INCQS - FIOCRUZ
W135ATCC	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup W135, ATCC35559	INCQS - FIOCRUZ
M2	<i>N.meningitidis</i> isogenic mutant Δ NMB0065:: <i>QaaDA</i>	[18]
M6	<i>N.meningitidis</i> W135ATCC transformed with pLAN13 to generate a fused strain <i>synG::ermAM</i>	[18]

obtained by homologous recombination were checked by Polymerization Chain Reaction - PCR analysis using an oligonucleotide harboring the target gene and another harboring the cassette.

Construction of NMB0065 mutant by polar mutation

This mutant construction follows the specifications described by Hollanda *et al.* [18]. Briefly, the NMB0065 sequence from *N. meningitidis* C2135 was amplified using 03.12-3 and 03.12-4 oligonucleotides (table 2). This fragment was cloned into the pGEM-T Easy Vector System II (Promega Corporation, Madison, WI, USA), to generate the plasmid pLAN6. *E. coli* strain Z501 was transformed with plasmid pLAN6 resulting in the plasmid pLAN7. The *QaaDA* cassette was inserted into the *BclI* site of pLAN7 to generate plasmid pLAN45, which was transformed into the C2135 strain, generating the mutant strain M2 (Figure 2).

Construction of serogroup W135 mutants in transcriptional fusion *synG::ermAM*

As the mutant M2, this mutant construction follows the specifications described in Hollanda *et al.* [18]. Briefly, the *synG* gene responsible for the synthesis of the W135 capsule was amplified using the 98-30 and 03-12-5 oligonucleotides (table 2) from the serogroup W135 strain

W135ATCC. The amplified fragment was cloned into the pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA), to generate the plasmid pLAN11 (Figure 3). Another fragment was amplified using the 04-02-2/*galE*CK29A from *synG* downstream sequence, cloned into pGEM-T Easy Vector, to generate pLAN52. The *ermAM* cassette was amplified by ERAM1/ERAM3 and inserted into *NcoI* site of pLAN52 to generate pLAN53. The fragment amplified from pLAN53 with the ERAM1 and *galE*CK29A [19] was inserted into *PstI* site of pLAN11 to generate pLAN13-2. This plasmid was linearised by the enzyme *SphI* and transformed into W135_{ATCC} strain to generate the *synG::ermAM* fused strain M6, erythromycin resistant.

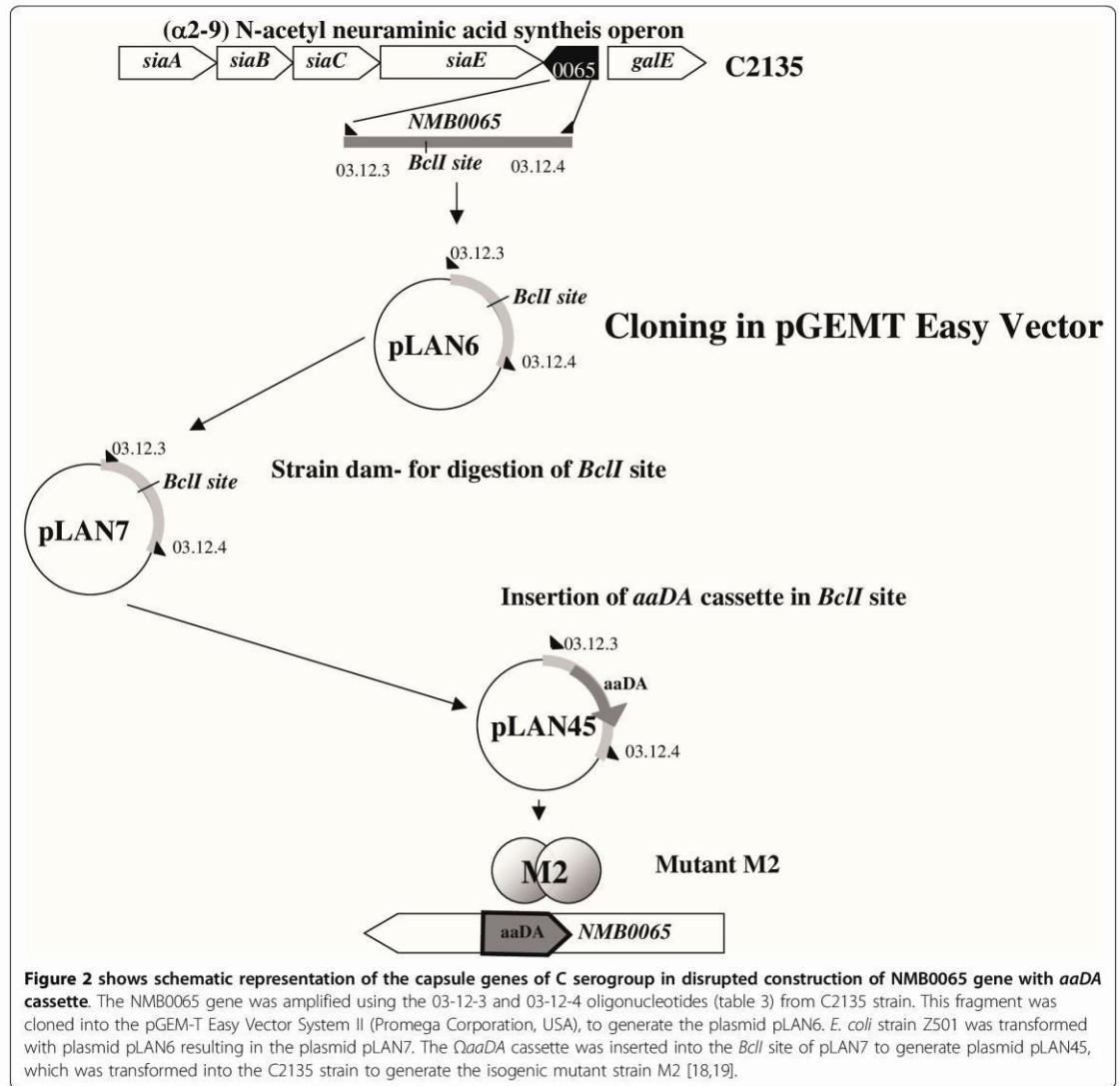
Analysis of transformation frequency up to MWCNT contact

At 1.10⁸ colony-forming units - CFU - of the receptor strain C2135, we added 1 μ g genomic DNA from M2 and M6 mutants and 10, 20 and 50 μ g of different MWCNT. A negative control was also performed without MWCNT. The suspension was incubated for three hours at 37°C in atmosphere of 5% of CO₂ by three hours. The counts of total CFU were performed in GCB spectinomycin or erythromycin plates in triplicate analysis (for M2 and M6 isogenic mutants, respectively). The

Table 2 Oligonucleotides used in this work

Oligonucleotide	Sequence 5'-3'	Description
03.12-3	TGCGGATCCGCAGTAATTTATCGGTTGG	NMB0065 forward
03.12-4	CCCCACTACCTAAAAATGCTGATTTG	NMB0065 reverse
aadA1	TGCCGTCACGCAACTGCTCCA	<i>QaaDA</i> forward
aadA2	CAACTGATCTGCGCGGAGGC	<i>QaaDA</i> reverse
98.30	GGTGAATCTTCGAGCAGGAAA	<i>synG</i> forward
98.31	AAAGCTGCGCGGAAGAATAGTG	<i>synG</i> reverse
03.12-5*	TCGGGATCCTTATTTTCTTGGCCAAAA	<i>synG</i> reverse
04.02-1	CAATGAATCTCGCGTTGCTGTAGGTG	<i>synG</i> forward
04.02-2	GAAAAATAATTTGGGGCTTAGG	<i>synG</i> forward
galECK29A	CTTCCATCATTTGTGCAAGGCTGC	<i>galE</i> reverse
ERAM1	GCAAACCTAAGAGTGTGTGATAG	<i>ermAM</i> forward
ERAM3	AAGCTTCCGCTCTGAATGGGACCTCTTA GCTTCTTGG	<i>ermAM</i> reverse

*The underlined sequences in italic are the insertion of the *BamHI* site into original sequence



CFU obtained in plates containing specific antibiotic were analyzed by PCR for the presence of target gene transfer in the transforming units (*aaDA* cassette for the M2 DNA and *synG* for M6 donor DNA). In order to verify the interaction between DNA, MWCNT and DNase action, the same amounts of DNA (1 μ g) from M2 and M6 mutants, MWCNT (20 μ g) and bacterial cells were submitted to action 5 U of DNase (New England Biolabs, UK) and further transformation process. Also, the counts of cfu were performed in GCB spectinomycin or erythromycin plates in triplicate analysis (for M2 and M6 isogenic mutants respectively).

Analysis of interaction between DNA and MWCNT by Raman spectroscopy

The prior analysis of DNA from M2 and M6 mutant strains with MWCNT was performed under a mix of 1 μ g of M6 genomic DNA and 20 μ g of MWCNT. The samples were characterized by Raman spectroscopy [20,21]. The spectra were recorded at room temperature using a Renishaw microprobe in Via system, employing an UV laser for excitation ($\lambda = 325$ nm) at about 10 mW. The samples M2 and M6 were dripped onto a quartz substrate for UV laser Raman spectroscopy.

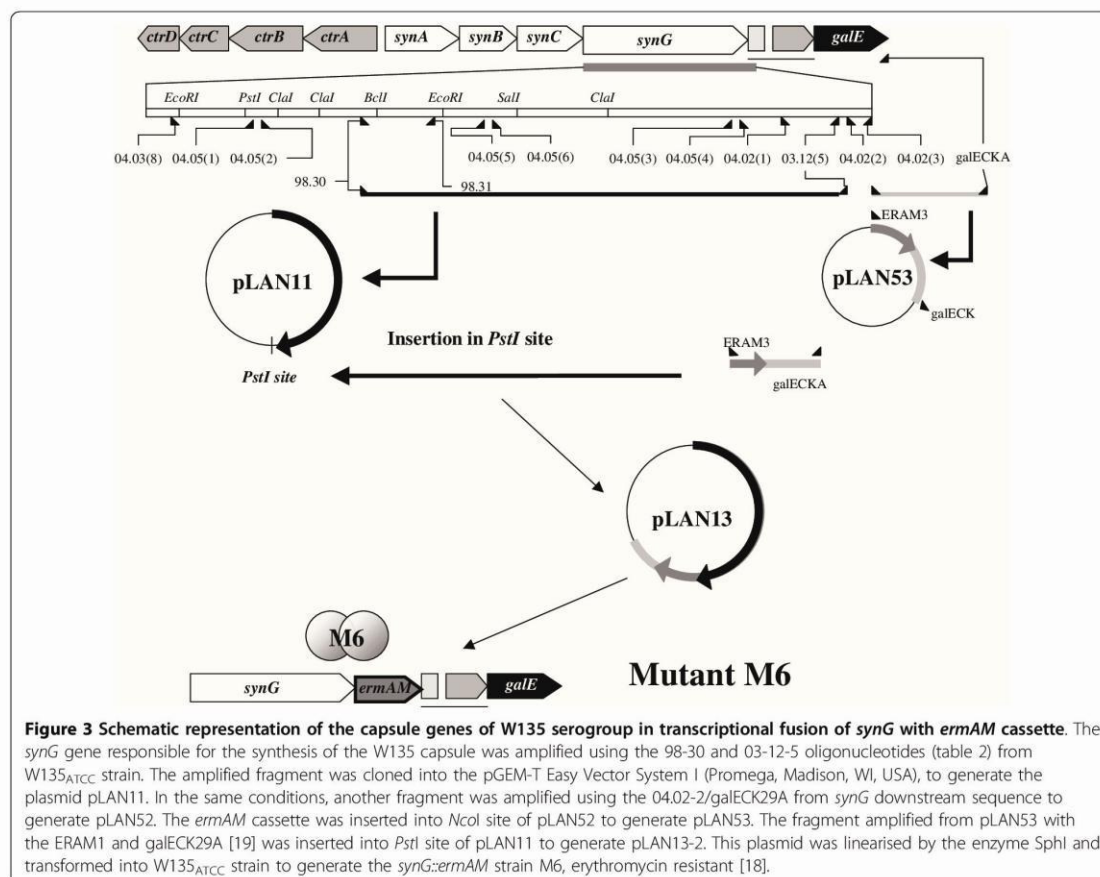


Figure 3 Schematic representation of the capsule genes of W135 serogroup in transcriptional fusion of *synG* with *ermAM* cassette. The *synG* gene responsible for the synthesis of the W135 capsule was amplified using the 98-30 and 03-12-5 oligonucleotides (table 2) from W135_{ATCC} strain. The amplified fragment was cloned into the pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, USA), to generate the plasmid pLAN11. In the same conditions, another fragment was amplified using the 04.02-2/*galE*CK29A from *synG* downstream sequence to generate pLAN52. The *ermAM* cassette was inserted into *NcoI* site of pLAN52 to generate pLAN53. The fragment amplified from pLAN53 with the *ERM1* and *galE*CK29A [19] was inserted into *PstI* site of pLAN11 to generate pLAN13-2. This plasmid was linearised by the enzyme *SphI* and transformed into W135_{ATCC} strain to generate the *synG::ermAM* strain M6, erythromycin resistant [18].

Results and discussion

The effects of the MWCNT were verified by an increase in the number of CFU obtained from many transformation processes. The CFU number resulting from the transformation process using DNA from M2 donor strain was higher than the one obtained using M6 as the donor strain. Also, the use of three different MWCNT and three different concentrations (10, 20 and 50 µg of each MWCNT) showed an increase in the number of CFU resulted from the transformation process using both DNA donor strains (Figure 4(c-d) and table 3).

The intention of two different DNA donors was to certificate the independence of MWCNT action under the same bacterial strain - *N. meningitidis* C2135. Further analysis by PCR demonstrated the transfer of the tagged gene from M2 and M6 in transformed strains (data not shown). The Raman analysis showed the interaction of MWCNT with the DNA obtained from M6 mutant strains as viewed in Figure 4(a-b).

Data analyses were made by ratio values between the numbers of transformants cfu obtained with MWCNT by median values of transformants cfu obtained without nanotubes treatment (Figures 4c-d and table 3). The values were analyzed by one-way analysis of variance ANOVA (Tukey's test compared each treatment to control without nanoparticles in transformation, considering significant values of $P > 0.05$). Some values obtained with commercial MWCNT - NC and NT2 showed different results when compared with NT1 (table 3 and Figure 4).

The relations between the meningococci transformation and MWCNT action viewed in these results could mimic the presence of carbon nanoparticles in atmosphere and evoke the emergence of outbreaks of Brazilian purpuric fever (BPF) caused by another naturally competent bacteria, *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius* [22,23]. The *Haemophilus influenzae* biotype *aegyptius* causes BPF, a dangerous inflammatory disease known as *purpura fulminans* with a great mortality rate

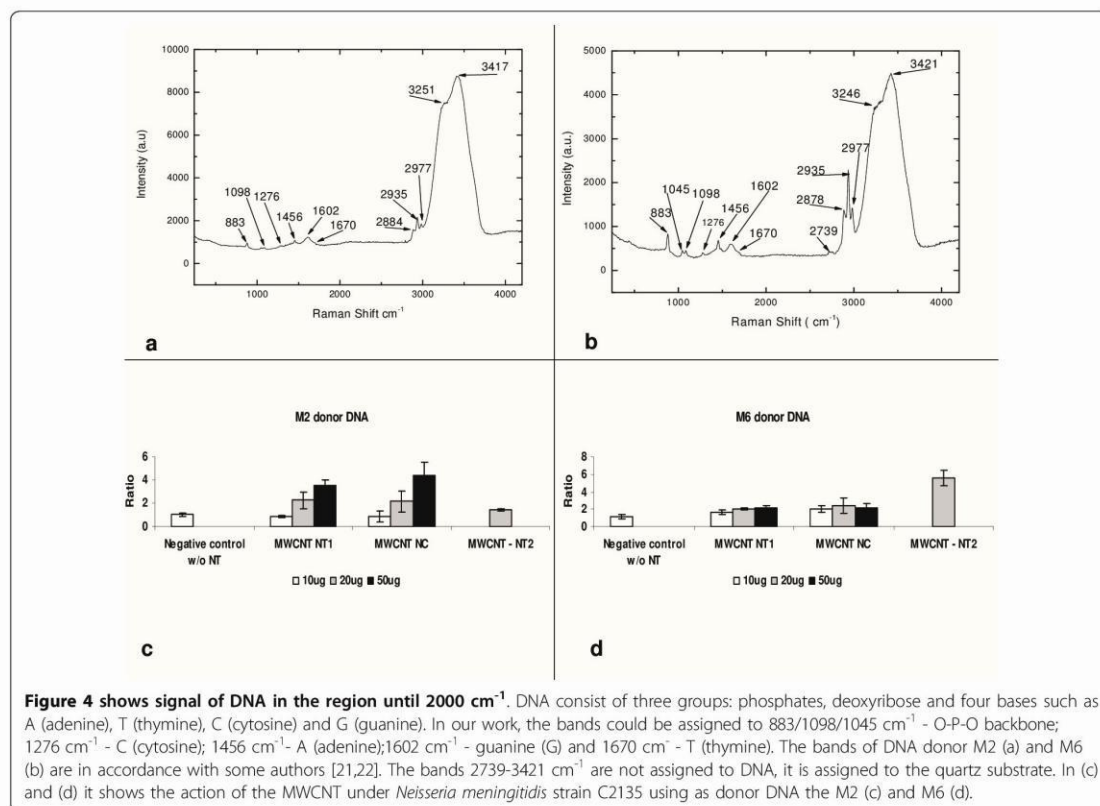


Figure 4 shows signal of DNA in the region until 2000 cm⁻¹. DNA consist of three groups: phosphates, deoxyribose and four bases such as A (adenine), T (thymine), C (cytosine) and G (guanine). In our work, the bands could be assigned to 883/1098/1045 cm⁻¹ - O-P-O backbone; 1276 cm⁻¹ - C (cytosine); 1456 cm⁻¹ - A (adenine); 1602 cm⁻¹ - guanine (G) and 1670 cm⁻¹ - T (thymine). The bands of DNA donor M2 (a) and M6 (b) are in accordance with some authors [21,22]. The bands 2739-3421 cm⁻¹ are not assigned to DNA, it is assigned to the quartz substrate. In (c) and (d) it shows the action of the MWCNT under *Neisseria meningitidis* strain C2135 using as donor DNA the M2 (c) and M6 (d).

Table 3 Values obtained from C21 35 transformation using the donor DNA from M2 and M6 mutants.

Donor DNA (1 µg)	Ratio (means obtained exposed to MWCNT/mean of negative control)	P values (one way Tukey's test)
Negative Control (without MWCNT) M2	1.02 ± 0.17	
NT1 (10 µg)	0.89 ± 0.09	P = 0, 1631 (non significant)
NT1 (20 µg)	2.24 ± 0.70	P < 0, 05 (P = 0, 0496 significant)
NT1 (50 µg)	3.52 ± 0.50	P < 0, 05 (P = 0, 0073 very significant)
NC (10 µg)	0.85 ± 0.50	P = 0, 3166 (non significant)
NC (20 µg)	2.18 ± 0.90	P = 0, 0798 (non significant)
NC (50 µg)	4.36 ± 1.18	P < 0, 05 (P < 0, 0020 significant)
NT2 (20 µg)	1.42 ± 0.13	P < 0, 05 (P = 0, 0240 significant)
Negative Control (without mesoporous silim6)	1.09 ± 0.25	
NT1 (10 µg)	1.71 ± 0.25	P < 0, 05 (P = 0, 0385 significant)
NT1 (20 µg)	2.03 ± 0.08	P < 0, 05 (P = 0, 0034 very significant)
NT1 (50 µg)	2.11 ± 0.30	P < 0, 05 (P = 0, 0106 significant)
NC (10 µg)	2.03 ± 0.35	P < 0, 05 (P = 0, 0193 significant)
NC (20 µg)	2.44 ± 0.88	P < 0, 05 (P = 0, 0490 significant)
NC (50 µg)	2.14 ± 0.49	P < 0, 05 (P = 0, 0403 significant)
NT2 (20 µg)	5.58 ± 0.86	P < 0, 05 (P = 0, 0065 very significant)

[24]. Kroll *et al.* [24] described these *Haemophilus influenzae* strains, usually associated with conjunctivitis cases, as a product of horizontal transfer between *N. meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. In the same geographic region of these outbreaks, the primitive agricultural practice, performed by burning sugar cane, generates an emission of carbon micro and nanoparticles in the atmosphere, potentially provoking respiratory disorders by particles inhalation [25]. Our group has been studying these bacteria and testing them with MWCNT on its transformation process.

This process is similar to the phenomena of capsular switching as described in sub Saharan African [26-28] and Saudi Arabian regions (Hajj pilgrimage) [26,29-35]. In desert zones, the *ramarthan* wind and the presence of silica nanostructures facilitates the capsular switching process in meningococci strains [26,29-36]. Thus, new experiments using animal models that could confirm this hypothesis have been performed by our group. Also, the increases in the transformation capacity in bacteria

have been verified in *Escherichia coli* by nanotube structures, as described by Rojas-Chapana *et al.* [37].

The results of DNase inhibition over free DNA (Figure 5) could explain the protection of the bacterial genes by MWCNT contact in this nanostructure. This evidence is showed in the graphic of Figure 5 with the increase of CFU in the test containing DNase-treated DNA and exposed to 20 μ g of MWCNT. These results need further experiments in order to better understand this interaction between bacterial compounds and the transformation system (represented in Figure 5). Furthermore, animal models, for these studies, may be very interesting for future assessments of atmospheric contamination by carbon nanoparticles produced by primitive agriculture and carbon miners.

This work indicated, for the first time in scientific literature, that the action of atmospheric nanoparticles obtained from anthropic activities, such as primitive agriculture, influences the bacterial transformation process.

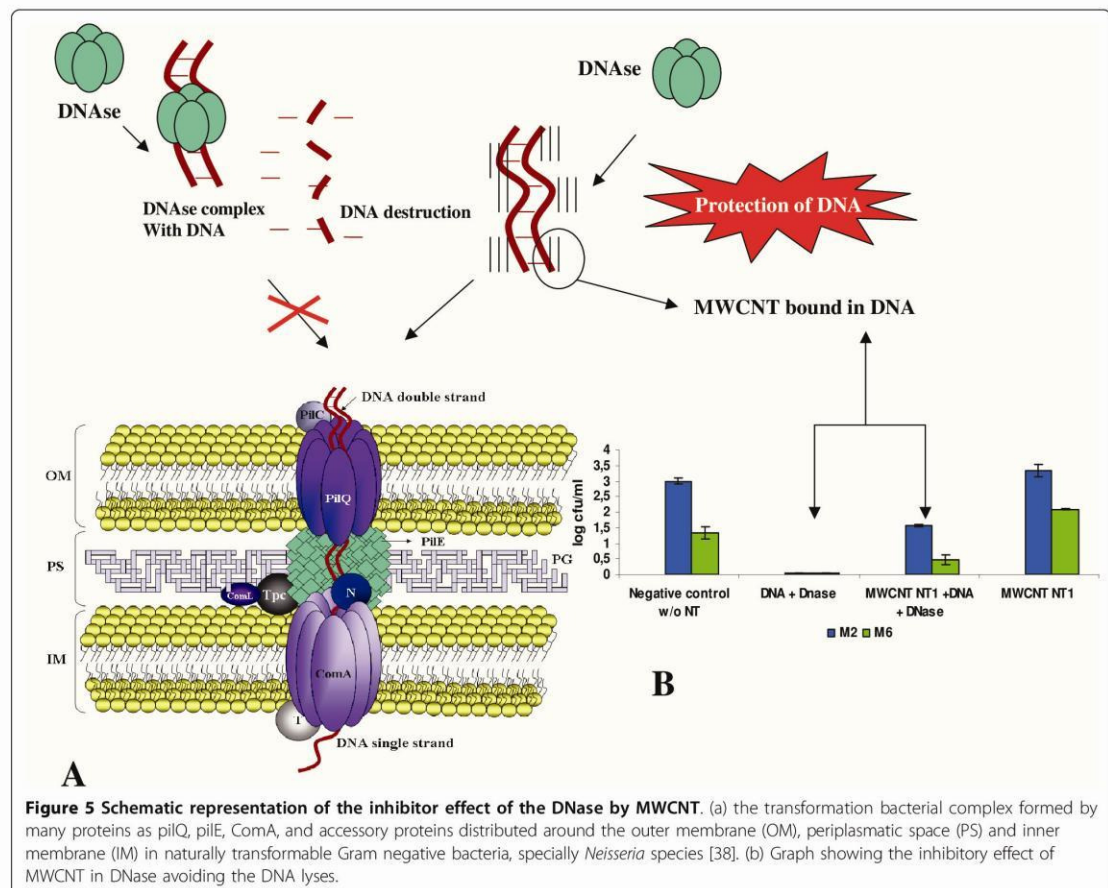


Figure 5 Schematic representation of the inhibitor effect of the DNase by MWCNT. (a) the transformation bacterial complex formed by many proteins as pilQ, pilE, ComA, and accessory proteins distributed around the outer membrane (OM), periplasmic space (PS) and inner membrane (IM) in naturally transformable Gram negative bacteria, specially *Neisseria* species [38]. (b) Graph showing the inhibitory effect of MWCNT in DNase avoiding the DNA lyses.

Conclusion

The increase in the transformation capacity mediated by MWCNT in meningococci indicates an interaction of these particles with the bacterial DNA leading to virulence acquisition and an increase in the escape to vaccination. The presence of these nanoparticles protects the DNA from DNase action, increasing the recombination frequency. These results show that important measures for public health, in places where the MWCNT or carbon microparticles are produced, need to be carefully revised.

Acknowledgements

This study has been financed by CAPES, FAPESP and CNPq. These supports helped us to supply reagent and equipments for the entire research development. FAPESP (number 2008/56777-5) and CNPq (number 575313/2008-0) supported the Laboratory of Biotechnology (Coordinated by M.L.). CAPES supported NanoEng (Coordinated by VB, Nanobiotechnology Program - Effects of carbon nanotubes under biological systems) and the personal fellowships for LMH, HJC. Thanks for the English revision to Júlia N. Varela and Maria Cecília T. Amstalden.

Author details

¹LABIOtec - Biotechnology Laboratory, Department of Biochemistry, Institute of Biology CP6109, University of Campinas - UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. ²NanoEng - NanoEngineering and Diamond Laboratory, School of Electrical and Computer Engineering, Department of Semiconductors, Instruments and Photonics, University of Campinas, UNICAMP, Av. Albert Einstein N.400, CEP 13 083-852 Campinas, São Paulo, Brasil.

Authors' contributions

IBM carried out the Molecular Biology design and plasmids; DAA carried out the molecular microbiologic tests; LMH carried out the molecular genetics studies; HJC carried out the MWCNT synthesis and FESEM, HRTEM and Raman tests; VB participated in the drafting of the manuscript and gave technical support in Nanoengineering; ML carried out the molecular genetics studies and also the draft of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 24 March 2011 Accepted: 16 November 2011
Published: 16 November 2011

References

- Tonjum T, Koomey M: The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships—a review. *Gene* 1997, **192**:155-163.
- Alonso JM, Guiyoule A, Zarantonelli ML, Ramisse F, Pires R, Antignac A, Deghmane AE, Huerre M, van der Werf S, Taha MK: A model of meningococcal bacteremia after respiratory superinfection in influenza A virus-infected mice. *FEMS Microbiol Lett* 2003, **222**:99-106.
- Nassif X, So M: Interaction of pathogenic neisseriae with nonphagocytic cells. *Clin Microbiol Rev* 1995, **8**:376-388.
- Spinosa MR, Progida C, Tala A, Cogli L, Alifano P, Bucci C: The Neisseria meningitidis capsule is important for intracellular survival in human cells. *Infect Immun* 2007, **75**:3594-3603.
- Frosch M, Muller D, Bousset K, Muller A: Conserved outer membrane protein of Neisseria meningitidis involved in capsule expression. *Infect Immun* 1992, **60**:798-803.
- Taha MK: Molecular detection and characterization of Neisseria meningitidis. *Expert Rev Mol Diagn* 2002, **2**:143-150.
- Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Gieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS: Capsule switching of Neisseria meningitidis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:271-276.
- Zarantonelli ML, Lancellotti M, Deghmane AE, Giorgini D, Hong E, Ruckly C, Alonso JM, Taha MK: Hyperinvasive genotypes of Neisseria meningitidis in France. *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**:467-472.
- Lancellotti M, Guiyoule A, Ruckly C, Hong E, Alonso JM, Taha MK: Conserved virulence of C to B capsule switched Neisseria meningitidis clinical isolates belonging to ET-37/ST-11 clonal complex. *Microbes Infect* 2006, **8**:191-196.
- Kriz P, Musilek M, Skoczynska A, Hryniewicz W: Genetic and antigenic characteristics of Neisseria meningitidis strains isolated in the Czech Republic in 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, **19**:452-459.
- Alcala B, Salcedo C, de la Fuente L, Arreaza L, Uriá MJ, Abad R, Enriquez R, Vazquez JA, Motge M, de Batlle J: Neisseria meningitidis showing decreased susceptibility to ciprofloxacin: first report in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2004, **53**:409.
- Alcala B, Salcedo C, Arreaza L, Berron S, De La Fuente L, Vazquez JA: The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. *J Med Microbiol* 2002, **51**:1102-1106.
- Perez-Trallero E, Vicente D, Montes M, Cisterna R: Positive effect of meningococcal C vaccination on serogroup replacement in Neisseria meningitidis. *Lancet* 2002, **360**:953.
- Taha MK, Bichier E, Perrocheau A, Alonso JM: Circumvention of herd immunity during an outbreak of meningococcal disease could be correlated to escape mutation in the porA gene of Neisseria meningitidis. *Infect Immun* 2001, **69**:1971-1973.
- Zarantonelli ML, Antignac A, Lancellotti M, Guiyoule A, Alonso JM, Taha MK: Immunogenicity of meningococcal PBP2 during natural infection and protective activity of anti-PBP2 antibodies against meningococcal bacteraemia in mice. *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:924-930.
- Grecco AC, Paula RF, Mizutani E, Sartorelli JC, Milani AM, Longhini AL, Oliveira EC, Pradella F, Silva VD, Moraes AS, et al: Up-regulation of T lymphocyte and antibody production by inflammatory cytokines released by macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Nanotechnology* 2006, **17**:265103.
- Hanahan D, Meselson M: Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* 1983, **100**:333-342.
- Hollanda LM, Cury GC, Pereira RF, Ferreira GA, Sousa A, Sousa EM, Lancellotti M: Effect of mesoporous silica under Neisseria meningitidis transformation process: environmental effects under meningococci transformation. *J Nanobiotechnology* 2011, **9**:28.
- Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, Urwin R, Stephens DS: Genetic basis for nongroupable Neisseria meningitidis. *J Infect Dis* 2003, **187**:1616-1628.
- Sun L, Sun Y, Xu F, Zhang Y, Yang T, Guo C, Liu Z, Li Z: Atomic force microscopy and surface-enhanced Raman scattering detection of DNA based on DNA-nanoparticle complexes. *Nanotechnology* 2009, **20**:125502.
- Palma BF, Ferrari AB, Bitar RA: DNA extraction systematics for spectroscopic studies. *Sensors* 2008, **9**.
- Davis J, Smith AL, Hughes WR, Golomb M: Evolution of an autotransporter: domain shuffling and lateral transfer from pathogenic Haemophilus to Neisseria. *J Bacteriol* 2001, **183**:4626-4635.
- Li MS, Farrant JL, Langford PR, Kroll JS: Identification and characterization of genomic loci unique to the Brazilian purpuric fever clonal group of H. influenzae biogroup aegyptius: functionality explored using meningococcal homology. *Mol Microbiol* 2003, **47**:1101-1111.
- Kroll JS, Wilks KE, Farrant JL, Langford PR: Natural genetic exchange between Haemophilus and Neisseria: intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:12381-12385.
- Ribeiro H, Assunção JV: Efeitos das queimadas na saúde humana. *Estudos Avançados* 2002, **16**:24.
- Alonso JM, Bertherat E, Perea W, Borrow R, Chanteau S, Cohet C, Dodet B, Greenwood B, LaForce FM, Muros-Le Rouzic E, et al: From genomics to surveillance, prevention and control: new challenges for the African meningitis belt. *Bull Soc Pathol Exot* 2006, **99**:404-408.
- Caugant DA, Nicolas P: Molecular surveillance of meningococcal meningitis in Africa. *Vaccine* 2007, **25**(Suppl 1):A8-11.
- Zombre S, Hacen MM, Ouango G, Sanou S, Adamou Y, Koumare B, Konde MK: The outbreak of meningitis due to Neisseria meningitidis W135 in 2003 in Burkina Faso and the national response: main lessons learnt. *Vaccine* 2007, **25**(Suppl 1):A69-71.

29. Wilder-Smith A: **Meningococcal vaccine in travelers.** *Curr Opin Infect Dis* 2007, **20**:454-460.
30. Wilder-Smith A, Barkham TM, Chew SK, Paton NI: **Absence of *Neisseria meningitidis* W-135 electrophoretic Type 37 during the Hajj, 2002.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:734-737.
31. Wilder-Smith A, Barkham TM, Earnest A, Paton NI: **Acquisition of W135 meningococcal carriage in Hajj pilgrims and transmission to household contacts: prospective study.** *Bmj* 2002, **325**:365-366.
32. Wilder-Smith A, Barkham TM, Ravindran S, Earnest A, Paton NI: **Persistence of W135 *Neisseria meningitidis* carriage in returning Hajj pilgrims: risk for early and late transmission to household contacts.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:123-126.
33. Wilder-Smith A, Goh KT, Barkham T, Paton NI: **Hajj-associated outbreak strain of *Neisseria meningitidis* serogroup W135: estimates of the attack rate in a defined population and the risk of invasive disease developing in carriers.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**:679-683.
34. Wilder-Smith A, Memish Z: **Meningococcal disease and travel.** *Int J Antimicrob Agents* 2003, **21**:102-106.
35. Wilder-Smith A, Paton NI, Barkham TM, Earnest A: **Meningococcal carriage in Umra pilgrims returning from Saudi Arabia.** *J Travel Med* 2003, **10**:147-149.
36. Wilder-Smith A: **W135 meningococcal carriage in association with the Hajj pilgrimage 2001: the Singapore experience.** *Int J Antimicrob Agents* 2003, **21**:112-115.
37. Rojas-Chapana JA, Giersig M: **Multi-walled carbon nanotubes and metallic nanoparticles and their application in biomedicine.** *J Nanosci Nanotechnol* 2006, **6**:316-321.
38. Dubnau D: **DNA uptake in bacteria.** *Annu Rev Microbiol* 1999, **53**:217-244.

doi:10.1186/1477-3155-9-53

Cite this article as: Mattos *et al.*: Effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) under *Neisseria meningitidis* transformation process. *Journal of Nanobiotechnology* 2011 **9**:53.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

