



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Simone da Costa Cruz

**Desenvolvimento e manutenção de memória imunológica após imunização
contra *Neisseria meningitidis* B com a vacina VA-MENGOC-BC®**

Rio de Janeiro

2011

Simone da Costa Cruz

**Desenvolvimento e manutenção de memória imunológica após imunização contra
Neisseria meningitidis B com a vacina VA-MENGOC-BC®**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucimar Gonçalves Milagres

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C957 Cruz, Simone da Costa.
Desenvolvimento e manutenção de memória imunológica após
imunização contra *Neisseria meningitidis* B com a vacina VA-MENGOC-
BC®/ Simone da Costa Cruz. - 2011.
88 f.

Orientadora: Lucimar Gonçalves Milagres.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Microbiologia.

1. *Neisseria meningitidis*. 2. Meningite – Teses. 3. Vacinas
meningocócicas- Teses. 3. Especificidade de anticorpos. 4. Memória
imunológica. I. Milagres, Lucimar Gonçalves. II. Universidade do Estado
do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III.
Título.

CDU 576.8.095.21

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Simone da Costa Cruz

**Desenvolvimento e manutenção de memória imunológica após imunização contra
Neisseria meningitidis B com a vacina VA-MENGOC-BC®**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 08 de julho de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Junior
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Dra. Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - FIOCRUZ

Prof^a. Dra. Cristina Barroso Hofer
Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira - UFRJ

Prof^a. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UNIRIO

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

À minha família e à minha orientadora, pelo incentivo, carinho e compreensão durante o desenvolvimento desta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida me dando forças nos momentos de dificuldades.

Ao meu marido Alessandro, pelo incentivo, amor e compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao meu bebê que está a caminho, por trazer uma felicidade inexplicável, transmitindo serenidade para que eu pudesse concluir esta tese.

Aos meus pais, por sempre terem me incentivado em meus estudos, acreditando que um dia alcançaria os meus objetivos.

À Aline, minha irmã, pelo apoio emocional e nos experimentos em voluntários.

Ao Ricardo, meu irmão, pelo incentivo e apoio nas traduções e revisão dos artigos publicados.

À minha orientadora, Prof^a. Lucimar, que durante os últimos 9 anos de parceria acreditou no meu trabalho, sendo serena e amiga nos momentos de ansiedade e de insucessos.

À Simone Souza, pela amizade e por realizar as leituras dos experimentos de citometria de fluxo.

Aos colegas do laboratório 5, Aline, Felipe e Giselle, pelo apoio técnico, amizade e pelos momentos de descontração.

Aos voluntários, pois sem eles o objetivo deste estudo não seria alcançado.

Ao Prof. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade por gentilmente ter realizado a revisão deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da Disciplina de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas, pelo apoio teórico, técnico e metodológico.

Ao Instituto Adolfo Lutz, pela provisão da cepa Cu385/83.

Ao CNPq, CAPES, FAPERJ e SR-2/UERJ, pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A sabedoria da vida não consiste em fazer aquilo que se gosta, mas em gostar do que se faz.

Leonardo da Vinci

RESUMO

CRUZ, Simone da Costa. **Desenvolvimento e manutenção de memória imunológica após imunização contra *Neisseria meningitidis* B com a vacina VA-MENGOC-BC®**. 2011. 88 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Neisseria meningitidis é uma das principais causas de meningite bacteriana e septicemia em todo o mundo, acometendo principalmente crianças menores de 4 anos. Atualmente, não existe uma vacina universal contra o meningococo B (MenB). A imunidade protetora contra o meningococo caracteriza-se pela presença e persistência de anticorpos bactericidas, porém pouco se sabe sobre os mecanismos de desenvolvimento desta memória sorológica. Avaliamos em modelo animal e em humanos, a geração e manutenção das células secretoras de anticorpos (ASC) e dos linfócitos B de memória (LBm) após vacinação contra MenB. Utilizamos como referência a vacina diftérica (dT ou DTP), considerada ter ótima eficácia em humanos. Para o estudo em modelo animal, grupos de 6 a 8 camundongos suíços, fêmeas, de 5 a 6 semanas, foram imunizados com 3 doses da vacina VA-MENGOC-BC® ou DTP, via intramuscular, com intervalo de 2 semanas entre as doses. Aproximadamente 2, 4 ou 6 meses após a última dose, os animais receberam a dose reforço. A vacina anti-MenB induziu uma resposta primária de ASC maior que a resposta à dose reforço. Ao contrário, a resposta de ASC à vacina dT foi maior após o *booster*. A resposta de LBm anti-MenB permaneceu constante (média de 1%) ao longo de todo o estudo, mas a resposta ao toxóide diftérico (TD) foi maior após o *booster* (média de 1,9%) que após a imunização primária. A concentração de IgG, anticorpos bactericidas e opsonizantes contra MenB foi dose-dependente e foi reativada após a administração das doses reforços. Esses resultados sugerem que os LBm presentes no baço foram responsáveis pela forte resposta de anticorpos observada após a dose reforço. Para o TD, ambos ASC e LBm foram importantes na manutenção da memória sorológica. Para o estudo em humanos, seis voluntários foram imunizados com 3 doses da vacina VA-MENGOC-BC®, via intramuscular, com intervalo de 6 a 7 semanas entre as doses. Seis meses após a imunização primária, os indivíduos receberam uma dose reforço. Outro grupo de voluntários (n = 5) foi imunizado com uma dose reforço da vacina dT. Somente após a terceira dose da vacina anti-MenB foi possível detectar a presença de LBm em todos os indivíduos. Seis meses após a imunização primária, a frequência de LBm voltou ao seu nível basal e não foi reativada após a dose *booster*. A vacina dT também induziu uma resposta de LBm heterogênea, mas esta foi 5 vezes maior que a induzida por VA-MENGOC-BC®. A resposta de anticorpos funcionais anti-MenB foi de curta duração com pequena reativação após a dose reforço. As duas vacinas induziram diferentes frequências de LT de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) após a vacinação primária e após o *booster*. A resposta à dose *booster* foi caracterizada pelo aumento da população de linfócitos T_{CM} e diminuição de T_{EM}. A população de linfócitos T_{CM} apresentou maior ativação (CD69⁺) que os linfócitos T_{EM}, especialmente após a vacinação contra MenB. Concluindo, os dados desta tese indicam que a administração de 3 doses da vacina VA-MENGOC-BC® teve uma eficiência limitada em humanos e sugerem que a baixa eficácia da vacina, quando utilizada na década de 90 em São Paulo e no Rio de Janeiro, pode estar relacionada à deficiência na geração e manutenção de LBm específicos.

Palavras-chave: Memória imunológica. *Neisseria meningitidis* B. Anticorpo bactericida. Anticorpo opsonizante. Vacina.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis is one of the leading causes of bacterial meningitis and septicemia worldwide, particularly in children less than four years old. Currently, there is no universal vaccine against serogroup B meningococcus (MenB). Protective immunity against meningococcus is characterized by the presence and persistence of bactericidal antibody, but little is known about the mechanisms of development of the serological memory. In this study, we evaluated in animal model and in humans the generation and maintenance of antibody secreting cells (ASC) and memory B cell after vaccination against MenB. We used the diphtheria vaccine (dT or DTP) as a reference for efficacy in humans. Five to six-week old female Swiss mice in groups of 6 to 8 were immunized with three intramuscular injections of VA-MENGOC-BC[®] or DTP vaccine 2 weeks apart. Approximately 2, 4 or 6 months after the last dose, mice received a booster injection of the vaccine. Vaccination against MenB induced a higher ASC primary response compared with the booster response. In contrast, ASC response to dT was higher after booster than after primary immunization. Memory B-cell to MenB remained at constant levels (mean of 1%) during the whole study, but the response to diphtheria toxoid (TD) was higher after boosting (mean of 1.9%) when compared with the primary response. IgG, bactericidal and opsonic antibody concentrations to MenB was dose-dependent and was reactivated after booster doses. These data suggest that spleen memory B-cells were responsible for the strong boosting antibody response to MenB. For TD, both ASC and memory B-cell were important for maintenance of the serological memory. For the human study, six volunteers were immunized with three intramuscular injections of VA-MENGOC-BC[®] 6 to 8 weeks apart. Six months after the last dose, subjects received a booster dose. Another group of volunteers (n = 5) were immunized with a booster dose of dT vaccine. Three doses of vaccine were necessary to induce a detectable memory B-cell response against MenB in all individuals. However, these cells became undetectable 6 months later and for most of the individuals there was no reactivation of memory B-cells after boosting. The dT vaccine also induced a heterogeneous memory B-cell response but it was five-times higher than the response induced by VA-MENGOC-BC[®]. Functional antibodies induced by the MenB vaccine were of short duration with a small recall response. For both vaccines, the frequencies of central memory T-cells (T_{CM}) and effector memory-T cells (T_{EM}) have different profiles after primary vaccination and after booster. The recall response was characterized by increase in T_{CM} and decrease in T_{EM}. T_{CM} was markedly more activated (CD69⁺) than T_{EM}, especially after MenB vaccination. In conclusion, the data indicates that three doses of VA-MENGOC-BC[®] vaccine was of short effectiveness in humans and suggests that the low efficacy of the vaccine when used in the 90's in São Paulo and Rio de Janeiro, may be related to the deficiency in the generation and maintenance of specific memory B-cells.

Keywords: Immunological memory. *Neisseria meningitidis* B. Bactericidal antibody. Opsonic antibody. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Títulos de anticorpos bactericidas ($\log_2$) contra a cepa B:4,7:P1.19,15 em camundongos vacinados com diferentes doses de VA-MENGOC-BC [®]	50
Figura 2	Resposta de anticorpos opsonizantes avaliada como a emissão da fluorescência induzida durante o <i>burst</i> oxidativo dos neutrófilos	51
Figura 3	Frequência de ASC anti-TD proveniente de 6 dias de cultura (LBm)	61
Figura 4	Média dos percentuais de LT ($CD4^+$) de memória antes e em diferentes dias (3, 7, 14 e 28) após a dose <i>booster</i> da vacina dT	63
Figura 5	Frequência das populações de LT $CD4^+$ de memória expressando a molécula CD69, indicadora de ativação celular recente, após estimulação com o TD.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC	Células secretoras de anticorpos
BCR	Receptor de célula B
Blimp 1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
BSA	Soro albumina bovina
DOC	Deoxicolato de sódio
DM	Doença Meningocócica
dT	Vacina dupla bacteriana contra tétano e difteria
DTaP	Vacina DTP acelular
DTP	Vacina tríplice bacteriana contra tétano, difteria e coqueluche
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
fHBP	Proteína ligadora do fator H
GC	Centro germinativo
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KDO	2-ceto-3-desoxi-D-octonato
LB	Linfócitos B
LBm	Linfócitos B de memória
LCMV	Vírus da coriomeningite linfocítica
LOS	Lipooligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócitos T
LTm	Linfócitos T de memória
MenB	<i>Neisseria meningitidis</i> B
NadA	Adesina A de <i>Neisseria</i>
NHBA	Antígeno ligador de heparina
OMP	Proteínas de membrana externa
OMV	Vesículas de membrana externa
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

T_{CM}	Linfócitos T de memória central
TD	Toxóide diftérico
T_{EM}	Linfócitos T de memória efetora
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TSDS-PAGE	<i>Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TT	Toxóide tetânico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO MENINGOCOCO	17
2	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA	19
3	TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE	21
4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	22
5	VACINAS ANTI-MENINGOCÓCICAS	23
5.1	Vacinas contra os sorogrupos A, C, Y e W135.....	23
5.2	Vacinas contra o sorogrupo B.....	24
5.3	Vacinologia reversa	25
6	RESPOSTA IMUNE AO MENINGOCOCO	27
6.1	Imunidade inata	27
6.2	Imunidade humoral	29
6.3	Imunidade celular	30
7	MEMÓRIA IMUNOLÓGICA.....	31
7.1	Plasmócitos de vida longa.....	31
7.2	Linfócitos B de memória	33
7.3	A heterogeneidade dos linfócitos T de memória	35
8	OBJETIVOS	37
8.1	Objetivo geral.....	37
8.2	Objetivos específicos	37
8.2.1	<u>Estudo em camundongos</u>	37
8.2.2	<u>Estudo em humanos</u>	37
9	METODOLOGIA	38
9.1	Ensaio bactericida	38
9.2	Ensaio de opsonização.....	38
9.2.1	<u>Detoxificação das OMVs.....</u>	38
9.2.2	<u>Adsorção das OMVs as beads fluorescentes.....</u>	39
9.2.3	<u>Obtenção das células</u>	39
9.2.4	<u>Reação de opsonização.....</u>	39
9.3	Ensaio de proteção	40
10	RESULTADOS	41

10.1	Artigo 1 (estudo em modelo animal): Comparison of long-term humoral memory development after immunisation against <i>Neisseria meningitidis</i> B or diphtheria toxoid	41
10.2	Resultados complementares em modelo animal (não publicados)	49
10.2.1	<u>Resposta de anticorpos bactericidas</u>	49
10.2.2	<u>Resposta de anticorpos opsonizantes</u>	50
10.3	Artigo 2 (estudo em voluntários): Human antibody and memory B and T-cell responses after primary and booster immunisation against <i>Neisseria meningitidis</i> B	52
10.4	Resultados complementares em voluntários (não publicados)	61
10.4.1	<u>Avaliação da frequência de linfócitos B de memória em PBMC de voluntários vacinados com dT</u>	61
10.4.2	<u>Linfócitos T de memória</u>	62
11	DISCUSSÃO	64
12	CONCLUSÕES	72
12.1	Estudo em modelo animal	72
12.2	Estudo em humanos	73
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido	86
	ANEXO B – Documento de aprovação do estudo pelo CEP – HUPE – UERJ...	87
	ANEXO C – Documento de aprovação do estudo pelo CEA – UERJ	88

INTRODUÇÃO

A despeito da existência de vacinas bacterianas bem sucedidas, p. ex. tétano e difteria, muitas doenças bacterianas ainda não contam com tal medida eficaz de prevenção. Entre estas se destaca a doença meningocócica (DM) causada por *Neisseria meningitidis* B (MenB), principalmente em crianças menores de 2 anos de idade (Jodar et al., 2002). Entre 1989 e 1995, milhões de crianças de 3 meses a 13 anos de idade das cidades de São Paulo e Rio de Janeiro foram vacinadas com 2 doses da vacina Cubana, VA-MENGOC-BC[®] (Moraes et al., 1992). Porém, estudos de soroconversão (Milagres et al., 1994) e de caso-controle (Moraes et al., 1992) demonstraram que a eficácia da vacina variou com a faixa etária, sendo máxima (72%) em crianças de 4 a 6 anos, não havendo proteção para crianças menores de 2 anos.

Em contrapartida, a introdução da vacina tríplice bacteriana contra a difteria, o tétano e a coqueluche (DTP) no calendário de imunização infantil, resultou em um drástico declínio da incidência de difteria em todo o mundo (Galazca, 2000; Brasil, 2004). Após a imunização primária no primeiro ano de vida, doses reforços são recomendadas aos 5-6 anos de idade e, em seguida, a cada dez anos (FUNASA, 2002; Brasil, 2004). Tendo em vista o sucesso da vacina diftérica, utilizamos a mesma em modelo animal e no estudo em humanos a fim de compararmos o desenvolvimento e manutenção da memória imunológica após a vacinação contra MenB e contra o toxóide diftérico (TD).

A qualidade da resposta humoral é fundamental para a eficácia vacinal, e inclui a indução de anticorpos funcionais (p. ex. neutralizador ou bactericida), de distintas classes e subclasses e com alta avidéz (Lambert et al., 2005). Por outro lado, a duração da proteção é determinada pela geração e manutenção de linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT) de memória (Tough & Sprent, 2003).

Embora muitos conhecimentos sobre memória imunológica tenham sido produzidos nos últimos 10 anos, ainda restam muitas questões quanto aos mecanismos responsáveis pela geração e manutenção da mesma (Tough & Sprent, 2003). Especificamente sobre a vacina VA-MENGOC-BC[®], pouco tem sido descrito a respeito dos mecanismos responsáveis pela memória imunológica. Em estudos anteriores (Cruz et al., 2007) demonstramos, em modelo animal, que a medula óssea foi o principal sítio anatômico contendo células secretoras de anticorpos (ASC) específicas para MenB e que estas células se mantiveram por pelo menos 2 meses após a imunização primária, sugerindo a produção de plasmócitos ou ASC de vida longa. Um achado muito interessante deste estudo foi a correlação positiva entre as cinéticas

da resposta de anticorpos bactericidas e de ASC na medula, sugerindo que estas células foram responsáveis pela manutenção dos anticorpos bactericidas no soro.

A continuidade dessa investigação no presente trabalho resultou na publicação do “Artigo 1” (Cruz et al., 2010), que amplia o período de análise, comparando o desenvolvimento de memória imunológica humoral contra MenB ou contra o toxóide diftérico em modelo animal. Além disso, no “Artigo 2” (Cruz et al., submetido à publicação na revista Vaccine em 31/05/2011) avaliamos a resposta de anticorpos humanos e de LB e LT de memória após imunização primária e após a dose reforço contra MenB, investigando se os resultados obtidos em modelo animal se reproduziram em humanos.

Com isso, buscamos elucidar a geração e manutenção de memória imunológica após imunização com a vacina VA-MENGOC-BC[®], a fim de justificar a baixa eficácia da mesma quando utilizada na década de 90 em São Paulo e no Rio de Janeiro.

1 MORFOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DO MENINGOCOCO

Neisseria meningitidis é um coco Gram-negativo pertencente à Família Neisseriaceae. Estes cocos são imóveis, não esporulados, geralmente capsulados e piliados (Bovre, 1984).

Os principais antígenos de superfície do meningococo são a cápsula, as proteínas de membrana externa (OMP) e o lipopolissacarídeo (LPS), sendo estas estruturas utilizadas na classificação fenotípica da bactéria.

As cápsulas polissacarídicas de *N. meningitidis* são importantes determinantes de virulência, já que inibem a ativação do complemento e a fagocitose. Estas cápsulas são utilizadas como antígenos para o desenvolvimento de vacinas (Girard et al., 2006). A diferença antigênica e química da molécula de polissacarídeo determina a classificação do meningococo em sorogrupos. De acordo com estas diferenças, *N. meningitidis* é classificada em 12 sorogrupos: A, B, C, H, I, K, L, W135, X, Y, Z e Z' (29E) (Lifely et al., 1987; Popovic et al., 1999).

A cápsula do sorogrupo A é composta por *N*-acetilmanosamina-1-fosfato, ao passo que as cápsulas dos sorogrupos B, C, Y e W135 contêm ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico). Nos sorogrupos Y e W135, o ácido siálico é ligado à glicose ou galactose, respectivamente. Os sorogrupos B e C são homopolímeros de ácido siálico, mas diferem na ligação entre suas unidades repetitivas (α 2-8 e α 2-9, respectivamente). A cápsula do sorogrupo C é usualmente de-*O*-acetilada, o que não ocorre na cápsula do sorogrupo B (Morley & Pollard, 2002).

Estas diferenças sutis na cápsula do sorogrupo B são suficientes para impedi-la de ser um imunógeno eficiente em humanos, já que o ácido *N*-acetilneuramínico (α 2-8) é estrutural e antigenicamente idêntico aos glicopeptídios da molécula de adesão celular do sistema nervoso de fetos humanos e aos tecidos neurais e extra-neurais de adultos (Finne et al., 1983).

As OMPs são importantes na indução de anticorpos, bem como na interação e na aderência do meningococo às células do hospedeiro. A caracterização das OMPs de *N. meningitidis* através da determinação do peso molecular, comportamento em SDS-PAGE, susceptibilidade a enzimas proteolíticas e mapeamento protéico resultou na diferenciação de cinco classes estruturais: Classes 1 (45-47 Kd), 2 (40-42 Kd), 3 (37-39 Kd), 4 (32-34 Kd) e 5 (26-29 Kd) (Frasch, 1987).

PorA (classe 1) e PorB (classe 2 ou 3) são as duas principais porinas de *N. meningitidis* com seletividade para cátions e ânions, respectivamente (Tomassen et al.,

1990). Todos os meningococos expressam PorB e a maioria das cepas expressa PorA (Tsai et al., 1981). PorA é a principal proteína indutora de anticorpos bactericidas após a vacinação contra MenB (Milagres et al., 1998; Wedege et al., 1998; Milagres et al., 2000). As diferenças imunológicas encontradas em PorB e PorA são a base para a classificação do micro-organismo em sorotipos e subtipos, respectivamente (Frasch, 1987).

N. meningitidis, assim como outras bactérias Gram-negativas, possui uma endotoxina complexa localizada em sua membrana externa denominada LPS. Ao contrário de bactérias entéricas, o LPS do meningococo não apresenta cadeias repetitivas do antígeno O, sendo então conhecido como lipooligossacarídeo (LOS) (Yazdankhah & Caugant, 2004). O LOS mantém o core conservado composto por heptose fosfato e ácido 2-ceto-3-desoxi-D-octonato (KDO) ligados ao lipídio A. O lipídio A é uma molécula ativa que induz a resposta inflamatória e mudanças na sua conformação podem afetar a virulência bacteriana e a resposta biológica do hospedeiro (Kahler & Stephens, 1998).

A especificidade imunológica das moléculas de LOS determina os imunotipos (Tsai et al., 1987), como L3,7,9, o mais comumente encontrado em cepas patogênicas (Jones et al., 1992).

Resumindo, o fenótipo B:4,7:P1.19,15:L3,7,9 pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4,7, subtipo P1.19,15 e imunotipo L3,7,9.

2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA MENINGOCÓCICA

N. meningitidis é a causa mais comum de meningite bacteriana no mundo ocidental, principalmente em países que tenham introduzido a imunização universal contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). Além disso, a mortalidade por DM é consideravelmente maior que a produzida pela meningite causada por Hib (Schwartz et al., 1989). Em geral, essa mortalidade é de 8% (5% para meningite e 15-20% para sepse) e a maioria das mortes ocorre nas primeiras 24 horas (Tibby et al., 2002).

Cinco sorogrupos (A, B, C, Y e W135) de *N. meningitidis* são responsáveis pela ocorrência de um maior número de infecções em todo o mundo, o que oferece uma prospecção realista de eliminação da doença com a utilização de vacinas efetivas contra estes grupos (Rosenstein et al., 2001; Girard et al., 2006). Os sorogrupos B e C são responsáveis pela maior parte dos casos na Europa e nas Américas, enquanto que os sorogrupos A e C predominam na Ásia e na África. Os Estados Unidos, Suécia e Israel são os únicos países nos quais houve um aumento da incidência do sorogrupo Y na última década (Almeida-González et al., 2004). O sorogrupo W135 tem sido associado a surtos de meningite em peregrinos do Haji assim como uma ampla epidemia em Burkina Faso em 2002 e 2003 (Manchanda et al., 2006).

A maior incidência da DM é observada em países da África subsaariana no chamado “cinturão da meningite”, que se estende da Etiópia, no leste, ao Senegal, no oeste (Lapeysonnie, 1963). Nesses países, surgem grandes surtos aproximadamente a cada 5-10 anos durante a estação seca, com taxas de incidência anual de até 1.000 por 100.000 habitantes sendo registradas durante epidemia mais grave (Stephens et al., 2007). Embora o sorogrupo A seja o principal causador da DM na África, nos últimos 20 anos tem sido observada a emergência dos sorogrupos X e W135, com relatos de 134 casos do sorogrupo X na cidade de Niamey, capital do Níger, entre 1995 e 2000 (Djibo et al., 2003).

Em contraste com os ataques inesperados e de curta duração das epidemias causadas pelo sorogrupo A na África sub-Saariana, epidemias pelo sorogrupo B se desenvolveram gradualmente ao longo de vários anos. Estas epidemias têm acontecido na Europa (Noruega, Bélgica, Espanha, Holanda, Inglaterra, entre outros países), nos Estados Unidos, e em alguns países da América Latina (Cuba, Colômbia, Brasil e Chile). Por razões desconhecidas, epidemias causadas pelo sorogrupo B são raras na África e em outros países em desenvolvimento (Jodar et al., 2002).

No Brasil, a partir de 1971, duas extensas epidemias ocorreram na área metropolitana da Grande São Paulo, atingindo a proporção de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes. A primeira foi causada por *N. meningitidis* C e a segunda por *N. meningitidis* A (Morais et al., 1974). Em 1988, caracterizou-se uma nova onda epidêmica nesta região, causada por MenB, com coeficiente de incidência variando de 4,06 em 1988 a 4,46 casos por 100.000 habitantes em 1992 (Sacchi et al., 1992).

Atualmente, a DM ocorre com incidência de 3,32 casos por 100.000 habitantes e letalidade correspondente a 19,4% (SINAN/SVS/MS, 2005), onde o sorogrupo B é responsável por 30% dos casos de DM e o sorogrupo C induz 70% dos casos restantes que são notificados na maioria das regiões do país. Os casos da doença induzida pelo sorogrupo C são observados em diferentes faixas etárias, desde crianças com menos de 1 ano de idade até adultos jovens, com mais de 15 anos (Brasil, 2009).

3 TRANSMISSÃO E PATOGÊNESE

N. meningitidis está presente na nasofaringe de 8-25% da população, o que se traduz em centenas de milhões de portadores assintomáticos em todo o mundo, sendo os adolescentes os principais reservatórios (Rosenstein et al., 2001). A transmissão desse micro-organismo entre os humanos ocorre amplamente através de gotículas respiratórias e secreções, porém o tamanho do inóculo necessário para transmissão é desconhecido. Sua cápsula, importante fator de virulência descrito anteriormente, é uma estrutura altamente hidratada, o que favorece a proteção do meningococo durante a transmissão pelo ar entre os hospedeiros (Diaz Romero & Outschoorn, 1994).

Uma vez que o meningococo penetra na barreira da mucosa do trato respiratório superior e adere às células epiteliais humanas, uma série de interações ocorre resultando na formação de microcolônias na superfície epitelial (Stephens et al., 1983). As bactérias viáveis devem ser endocitadas pelas células epiteliais não-ciliadas, escapar, e então alcançar a submucosa ou invadir diretamente as superfícies epiteliais danificadas.

Em indivíduos susceptíveis, uma vez o sangue infectado, *N. meningitidis* sobrevive, se multiplica rapidamente e se dissemina por todo o corpo e para o cérebro. Em seguida, ocorre a passagem do meningococo através do endotélio vascular cerebral, resultando em infecção das meninges e do fluido cérebro-espinhal (Virji, 2009). A DM geralmente ocorre 1-14 dias após a aquisição do patógeno (Rosenstein et al., 2001).

4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Um dos grandes desafios do diagnóstico da DM é que as manifestações clínicas são difíceis de distinguir de outras infecções menos graves do trato respiratório superior (Almeida-González et al., 2004). O quadro da meningite aguda purulenta é forma usual de manifestação da infecção meningocócica (Rosenstein et al., 2001). Os sintomas se caracterizam por um início súbito de cefaléia, febre, rigidez na nuca, náusea, vômito, fotofobia e alterações neurológicas que podem incluir delírio, coma e convulsões. Em crianças, a meningite pode apresentar um início mais insidioso, com sintomas atípicos sem rigidez na nuca; no entanto, o abaulamento da fontanela pode ser característico (Stephens, 1999; Rosenstein et al., 2001). A meningococemia é difícil de ser reconhecida fora do cenário de um surto, no entanto se caracteriza por um início súbito de febre, havendo erupção cutânea purpúrica ou petequial que pode progredir para púrpura ou septicemia fulminante (Rosenstein et al., 2001).

5 VACINAS ANTI-MENINGOCÓCICAS

A doença invasiva está associada à ausência de anticorpos bactericidas e/ou opsonizantes e, portanto, pode ser prevenida através da indução desses anticorpos através da vacinação. A primeira vacina utilizada na prevenção da DM foi desenvolvida em 1912 (Cartwright, 1996). Scherp e Rake (1935) identificaram um material capsular a partir do meningococo como polissacarídeo (apud Cartwright, 1996). No entanto, o verdadeiro trabalho sobre vacinas meningocócicas iniciou-se somente após a emergência da resistência às sulfonamidas e à penicilina (Manchanda et al., 2006).

Um importante papel da imunização contra o meningococo é a indução de imunidade de rebanho, já que um percentual importante da população encontra-se colonizado por esse micro-organismo. O estado de portador pode ser reduzido em até 75% para alguns sorotipos, sendo essa redução associada à diminuição da incidência da doença em indivíduos não vacinados (Stephens, 2010).

5.1 Vacinas contra os sorogrupos A, C, Y e W135

As vacinas polissacarídicas capsulares contra os sorogrupos A, C, Y e W135 foram introduzidas nas décadas de 70 e 80 tomando como base os estudos clássicos de Gotschlich, Gold, Goldschneider e Artenstein (Gotschlich et al., 1969; Goldschneider et al., 1969a; Goldschneider et al., 1969b; Artenstein et al., 1970; Gold et al., 1975). Essas vacinas foram consideradas seguras e eficazes (>85%) em crianças maiores de 2 anos de idade e em adultos, porém menos imunogênicas em crianças menores de 2 anos. A imunidade às vacinas polissacarídicas limita-se entre 3 e 5 anos de proteção, além de haver uma redução da resposta imune após repetidas doses do polissacarídeo dos sorogrupos A e C. Além disso, as vacinas polissacarídicas não induzem memória imunológica e possuem pequeno ou nenhum efeito sobre o estado de portador. Apesar das suas limitações, as vacinas polissacarídicas têm sido usadas extensivamente no controle de epidemias nos países do “cinturão da meningite” na África (Stephens et al., 2007).

O maior avanço na prevenção da doença meningocócica foi o desenvolvimento de vacinas polissacarídicas conjugadas à proteína, tais como o toxóide tetânico ou CRM₁₉₇ (um peptídeo mutante relacionado ao toxóide diftérico). As vacinas polissacarídicas conjugadas foram introduzidas no Reino Unido, em outros países da Europa, no Canadá e nos Estados Unidos (Ramsay et al., 2003; Trotter et al., 2004; Larrauri et al., 2005; Snape & Pollard,

2005; Trotter et al., 2006). Essas vacinas são seguras e imunogênicas em crianças pequenas, induzem memória imunológica e diminuem o estado de portador do meningococo. Em 2000, a introdução da vacina conjugada contra o meningococo C no Reino Unido reduziu a DM causada por esse sorogrupo (90% de eficácia por 3 anos em indivíduos de 11 a 18 anos) (Trotter et al., 2004). O esquema de três doses da vacina conjugada na infância originalmente usado no Reino Unido forneceu apenas proteção transitória e uma dose reforço ou esquemas de imunização alternativos foram necessários. Desta forma, o Reino Unido mudou o esquema de imunização anterior para 2 doses da vacina conjugada contra o sorogrupo C aos 3 e 4 meses de idade, seguidas por uma dose reforço aos 12 meses (Trotter et al., 2006).

5.2 Vacinas contra o sorogrupo B

O desenvolvimento de vacinas contra MenB continua sendo um desafio em todo o mundo. A cápsula presente nas cepas do sorogrupo B é um homopolímero de $\alpha(2-8)$ ligado ao ácido N-acetilneuramínico que também está presente em tecidos de mamíferos e seu uso na composição de uma vacina poderia levar a respostas autoimunes (Finne et al., 1983; Lo et al., 2009). Desta forma, estratégias têm dado enfoque aos antígenos não-capsulares tais como as vesículas da membrana externa (OMV) e lipooligossacarídeos (Pizza et al., 2000; Zimmer & Stephens, 2006). A diversidade que ocorre nas principais OMPs do meningococo tem limitado essas perspectivas, porém o sucesso no controle de epidemias que são cepa-específicas, a identificação de novas proteínas de superfície conservadas para o uso em vacinas combinadas, a descoberta de novos epítomos capsulares de MenB (Pizza et al., 2000; Giuliani et al., 2006), e a pesquisa em vacinas lipooligossacarídicas sugerem oportunidades para a prevenção da DM causada por MenB.

Vacinas compostas por OMV foram desenvolvidas com sucesso no controle de surtos da doença causada pelo sorogrupo B em Cuba (Sierra et al., 1991), Noruega (Bjune et al., 1991) e, mais recentemente, na Nova Zelândia (Wong et al., 2009). Durante a década de 80 diversos estudos de eficácia foram realizados em Cuba, Brasil, Chile e Noruega. Embora as vacinas tenham apresentado eficácia de 50 a 80%, elas não forneceram proteção satisfatória às crianças menores de 4 anos de idade quando administradas em 2 doses (Jodar et al., 2002).

A pesquisa de campo realizada com a vacina cubana em 7 províncias daquele país, que abrangeu indivíduos de 11 a 16 anos, resultou em uma eficácia vacinal superior a 80% (Sierra et al., 1991). Entretanto, no Brasil, após imunização em massa de crianças de 3 a 83 meses de idade, observou-se que a eficácia da vacina foi de 74% para crianças acima de 4 anos, 47%

para crianças de 24 a 47 meses, não havendo proteção para crianças menores de 24 meses (-37%) (Moraes et al., 1992).

Na Noruega, um estudo de eficácia realizado com estudantes de escolas secundárias demonstrou que a proporção estimada de proteção contra MenB foi de 87% 10 meses após 2 doses, mas apenas 57% durante o período de 29 meses (Bjune et al., 1991). Concluiu-se, então, que a terceira dose seria necessária para induzir imunidade duradoura. A terceira dose aplicada tanto no esquema primário de imunização quanto como uma dose reforço (seis meses ou vários anos após a segunda dose) foi avaliada em vários estudos apresentando bons resultados (Feiring et al., 2006).

Recentemente, na Nova Zelândia, crianças menores de 5 anos de idade receberam 3 ou 4 doses da vacina contra MenB (Galloway et al., 2009). O resultado da pesquisa demonstrou que a vacina apresentou 80% de eficácia na redução do risco de epidemias por MenB 24 meses após concluir o esquema de vacinação recomendado.

A proteína PorA foi identificada como o principal alvo de anticorpos bactericidas induzidos por vacinas OMV (Milagres et al., 1998; Wedege et al., 1998; Milagres et al., 2000). Uma vez que PorA apresenta uma importante variação antigênica, a imunidade induzida por estas vacinas tem sido basicamente subtipo-específica. Partindo deste pressuposto, a tecnologia recombinante foi usada para produzir uma vacina hexavalente com 6 proteínas PorA (HexaMen). Os subtipos incluídos na vacina foram: P1.7,16; P1.5,2; P1.19,15; P1.5c,10; P1.12,13; P1.7h4. Um esquema de vacinação de 3 doses da vacina hexavalente foi avaliado em crianças de 2 grupos etários (2 a 3 anos e 7 a 8 anos). Após 5-9 meses as crianças receberam uma dose reforço da vacina. Alguns subtipos foram imunodominantes (P1.5c,10 e P1.5,2). Após 2 doses da vacina, 11% (P1.7h,4) a 95% (P1.5c,10) das crianças apresentaram um aumento significativo nos títulos de anticorpos bactericidas. Este percentual não diferiu significativamente após a dose reforço (de Kleijn et al., 2000). Embora a imunogenicidade desta vacina administrada em três doses tenha sido modesta em crianças menores de um ano, resultados satisfatórios foram obtidos após a quarta dose em crianças entre um e três anos de idade (Cartwright et al., 1999; Longworth et al., 2002).

5.3 Vacinologia reversa

A metodologia convencional utilizada no desenvolvimento de vacinas levou à identificação de antígenos abundantes na superfície bacteriana, porém muito variáveis e

pouco adequados para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra MenB. Desta forma, como dito anteriormente, essas vacinas têm sido importantes apenas para o controle de surtos. Após o sequenciamento do genoma bacteriano, todas as proteínas codificadas por um micro-organismo tornaram-se disponíveis, sendo possível identificar candidatos à vacina sem utilizar os princípios da vacinologia convencional (Mariel et al., 2008).

A vacinologia reversa fornece total acesso às proteínas que o micro-organismo pode codificar e, através da análise computacional, é possível identificar proteínas expostas na superfície de maneira reversa, iniciando o processo a partir do genoma em vez do micro-organismo (Mariel et al., 2008). Para o meningococo B, 570 proteínas foram selecionadas como potenciais candidatas à vacina, das quais 350 foram clonadas e expressas em *Escherichia coli* e, em seguida, purificadas e utilizadas na imunização de camundongos (Pizza et al., 2000). Os soros obtidos após imunização foram testados por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) e *Western blotting* a fim de avaliar sua atividade imunogênica e protetora. Vinte e oito proteínas foram positivas em todos os testes, porém apenas 5 foram consideradas conservadas num painel de 31 cepas de *N. meningitidis* isoladas em todo o mundo (Pizza et al., 2000).

Um estudo recente (Findlow et al., 2010) realizou testes em ensaio clínico de fase II com uma vacina recombinante contra MenB administrada na infância. Essa vacina contém três proteínas principais: adesina A de *Neisseria* (NadA), proteína ligadora do fator H (fHBP) e antígeno ligador de heparina (NHBA), formuladas ou não com OMV. Após 3 doses, ambas as vacinas foram imunogênicas contra cepas expressando NadA e fHBP homólogas ou relacionadas. No entanto, a formulação vacinal que continha as OMVs apresentou maior imunogenicidade, principalmente contra cepas expressando PorA homóloga. Embora esta vacina tenha apresentado o potencial de proteger crianças contra a DM, a extensão da proteção conferida aos antígenos heterólogos requer investigação adicional.

O sucesso ou o fracasso das vacinas que estão sendo avaliadas atualmente depende da indução da resposta imune funcional em crianças e da variedade de cepas circulantes que são mortas por anticorpos bactericidas. O desenvolvimento de novas vacinas contra *N. meningitidis* representaria um grande benefício para a saúde pública, tendo em vista a gravidade da doença meningocócica causada por um patógeno que está tão adaptado a subverter a resposta imune (Lo et al., 2009).

6 RESPOSTA IMUNE AO MENINGOCOCO

A natureza precisa da imunidade natural ao meningococo continua desconhecida, embora haja uma interação complexa entre o micro-organismo e a barreira mucosa da nasofaringe, com a participação dos mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida (Pollard & Frasch, 2001). O estudo da resposta do hospedeiro contra o meningococo é importante para o desenvolvimento de vacinas, principalmente no que se refere à capacidade de induzir resposta protetora e duradoura.

Dessa forma, em se tratando de infecções na infância, o principal objetivo da imunização é a indução de níveis protetores e duradouros de anticorpos específicos. No entanto, a persistência de anticorpos após a imunização de crianças menores de 4 anos tende a ser baixa quando comparada com crianças maiores ou adultos. Os mecanismos responsáveis pela persistência desses anticorpos ainda não foram muito bem esclarecidos (Crotty et al., 2003; Kelly et al., 2005). Além disso, existem evidências da presença de imunidade mesmo quando anticorpos específicos não são mais detectáveis. Desta forma, outros parâmetros além dos níveis de anticorpos podem ser usados para refletir mais apropriadamente imunidade duradoura.

6.1 Imunidade inata

A imunidade protetora contra *N. meningitidis* caracteriza-se pela presença de anticorpos anti-meningococo capazes de ativar o sistema complemento. No entanto, a ativação de células da imunidade inata que levam à indução desses anticorpos é apenas parcialmente entendida. Uma vez que o meningococo atravessa a barreira mucosa, os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune que ele irá encontrar. Essas células são também o tipo predominante encontrado no fluido cérebro-espinhal de pacientes acometidos com a meningite meningocócica durante a fase aguda da infecção e contribuem com a eliminação da bactéria quando a imunidade adaptativa ainda não tenha se estabelecido (Schmitt et al., 2009).

O sistema imune inato está focado em estruturas do patógeno evolutivamente conservadas, conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Os alvos de reconhecimento padrão são produtos

com aspectos únicos no metabolismo ou estrutura microbiana (Medzhitov et al., 1997; Janeway & Medzhitov, 2002).

Na doença meningocócica invasiva, o nível de LPS no plasma de pacientes está associado com o resultado da doença. Estudos *in vitro* indicam que o LPS parece ser um dos maiores estímulos para a liberação de citocinas durante o curso da infecção (Moller et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que polimorfismos raros no gene de TLR4 (*Toll-like receptor 4*, que se liga ao LPS) resultam no aumento da susceptibilidade à DM (Schroder & Schumann, 2005). Esta descoberta enfatiza o papel central do LPS como principal desencadeador da inflamação.

As porinas de *N. meningitidis* são os principais componentes protéicos da OMV presente na vacina cubana. Wetzler et al. (1996) demonstraram que essas proteínas são capazes de aumentar a resposta imune a substâncias fracamente imunogênicas (p. ex. polissacarídeos, peptídeos, glicolipídios etc.) e que o aumento da expressão de B7-2 na superfície de linfócitos B deve ser o mecanismo associado à potencialização da resposta imune. É importante mencionar que essas OMVs possuem LPS e lipoproteínas que ativam TLR4 e TLR2, respectivamente (Ingalls et al., 2000), e que os ligantes desses TLRs apresentaram atividade adjuvante em vários estudos em camundongos (Fransen et al., 2007). Recentemente, Fransen e colaboradores (2010) investigaram o papel de TLR2 e TLR4 na resposta imune após a imunização de camundongos contra *N. meningitidis* com uma vacina baseada em OMV. De maneira surpreendente, os camundongos *TLR2*^{-/-} não tiveram a resposta imune comprometida após imunização. Em contraste, camundongos deficientes em TLR4 apresentaram uma importante redução dos níveis de citocinas da imunidade inata, demonstrando que essa molécula é um alvo interessante a ser utilizada como adjuvante em vacinas.

O sistema complemento tem um papel central na proteção contra o meningococo. Estudos em indivíduos com deficiência nos componentes finais (C5-C9) da cascata do complemento demonstraram que estes indivíduos desenvolvem a DM e que uma parte deles tem ataques recorrentes (Ross & Densen, 1984; D'Amelio et al., 1992). É importante mencionar que existe uma relativa deficiência dos componentes finais do complemento na infância (Lassiter et al., 1992), o que contribui com a susceptibilidade à DM nesta faixa etária.

Sendo assim, o entendimento do início da resposta imune indica que a ativação das células da imunidade inata parece ser crucial para o direcionamento desta resposta para o desenvolvimento de imunidade humoral protetora. Além disso, polimorfismos genéticos em

receptores da imunidade inata ou em componentes da cascata de sinalização podem influenciar na susceptibilidade à DM (Emonts et al., 2003; Jack et al., 2006).

6.2 Imunidade humoral

Estudos realizados por Goldschneider et al. (1969a) demonstraram por evidências diretas e indiretas que títulos de anticorpos bactericidas anti-MenC ≥ 4 estavam associados à proteção contra a doença meningocócica. Porém, esses estudos também revelaram que os soros com títulos de anticorpos bactericidas < 4 não necessariamente prediz susceptibilidade à doença, uma vez que alguns indivíduos com títulos negativos encontravam-se colonizados pela cepa epidêmica e não desenvolviam a doença.

Recentemente, Trotter et al. (2007) demonstraram associação similar entre incidência da doença causada pelo MenB e ausência de títulos de anticorpos bactericidas ≥ 4 para crianças de 3 a 11 meses. Porém, diferente dos estudos de Goldshneider et al. (1969a), o declínio da DM causada por MenB em crianças de 1 a 10 anos de idade não foi acompanhado pelo aumento da prevalência de títulos bactericidas protetores (≥ 4), indicando que mecanismos alternativos foram responsáveis pela aquisição de imunidade protetora contra MenB nesta faixa etária. Estes mecanismos incluem a maturação cronológica do sistema complemento pela via alternativa (Ferriani et al., 1999), a aquisição de anticorpos bactericidas com títulos < 4 (Welsch & Granoff, 2007), atividade de opsonização (Plested & Granoff, 2008), ou a combinação destes mecanismos. Plested & Granoff (2008) demonstraram a indução de anticorpos opsonizantes após imunização contra MenB, havendo aproximadamente um terço dos soros com títulos bactericidas < 4 .

Dessa forma, embora exista uma clara associação entre títulos bactericidas ≥ 4 e proteção contra a DM, esta imagem de proteção é uma história incompleta (Granoff, 2009). Estes dados sugerem que algumas decisões de saúde pública poderão ser comprometidas ao basearem-se apenas nos títulos ≥ 4 como uma medida de proteção. Estas incluem o licenciamento ou não de uma nova vacina, a idade ótima para se administrar a vacina, o número de doses necessárias e a duração da imunidade protetora. Novas prioridades devem incluir o desenvolvimento de ensaios sorológicos e/ou celulares mais sensíveis e reprodutíveis a fim de avaliar a imunidade protetora à DM.

6.3 Imunidade celular

A imunidade celular na DM tem sido pouco estudada, possivelmente porque o principal mecanismo de proteção conhecido é mediado por anticorpos bactericidas (Vermont & van den Dobbelsteen, 2002). No entanto, os LT e as citocinas por eles secretadas exercem um papel central na regulação da troca de isotipos das imunoglobulinas (Ig) e na indução da memória imunológica (Romagnani et al., 2000).

Kornelisse et al. (1997) quantificaram citocinas no soro e no fluido cerebroespinal de crianças com meningite e encontraram níveis altos de interleucina-12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ), mas não de IL-6, IL-8 ou IL-10. Pollard et al. (1999) avaliaram a secreção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em pacientes convalescentes da DM. Os resultados demonstraram que em crianças menores de 4 anos existe uma tendência à resposta Th1, com baixa razão IL-10/ IFN- γ . Em contrapartida, a resposta das crianças maiores de 4 anos mostrou uma razão maior de IL-10/IFN- γ , indicando um perfil Th2. Estas diferenças provavelmente influenciaram na qualidade ou especificidade de anticorpos anti-MenB, explicando a falha da atividade bactericida em crianças menores de dois anos de idade (Pollard & Frasch, 2001).

Estudos realizados por Næss et al. (1998) demonstraram que após imunização com a vacina norueguesa, as OMVs induziram a proliferação de LT contra PorA e mais fracamente contra PorB. Além disso, houve uma correlação positiva entre a resposta de LT e os níveis de IgG anti-OMV. A análise comparativa de PorA, Opa e Opc em induzir a proliferação de LT humanos revelou uma hierarquia interessante na imunogenicidade destas células, com as proteínas Opa sendo as mais imunogênicas, seguidas pelas proteínas Opc e PorA (Wiertz et al., 1996).

Soros de indivíduos convalescentes da DM reagiram mais fortemente com as proteínas Opa do que com PorA ou PorB (Wedegge et al., 1998) e uma forte resposta de anticorpos específicos contra Opa e PorA foi observada após imunização com a vacina anti-OMV norueguesa (Rosenqvist et al., 1995). Como a ativação dos LB é influenciada pelos sinais fornecidos pelos LTh, a imunodominância de LT específicos para Opa poderia explicar os altos títulos de anticorpos contra estas proteínas após imunização ou convalescência (Wiertz et al., 1996).

7 MEMÓRIA IMUNOLÓGICA

Em geral, a proteção contra infecções adquirida após imunização é baseada principalmente em dois pilares: a indução de uma resposta imune protetora imediata e a formação de memória imunológica para prevenir futuras infecções (Luijkx et al., 2008). Para as infecções meningocócicas, a proteção imediata está baseada na atividade bactericida do soro (Goldschneider et al., 1969a), que é mediada por anticorpos produzidos por plasmócitos de vida longa e/ou LB de memória circulantes, que sofreram mudança de classe e maturação da afinidade (Slifka & Ahmed, 1998). A memória imunológica parece ser estabelecida por um *pool* de LB de memória específicos, requeridos em baixas quantidades para auto-renovação da população e para reposição dos plasmócitos em condições homeostáticas (Bernasconi et al., 2002).

Lanzavecchia et al. (2006) destacaram em seus estudos que componentes antígeno-dependentes e antígeno-independentes (estímulos policlonais) contribuem para a memória sorológica. A “memória sorológica de curta duração” é mediada pela produção de plasmócitos de vida curta e de vida longa, sendo necessária a presença do antígeno. Enquanto que a “memória sorológica de longa duração” é mediada pela ativação homeostática de LB de memória, independente da presença do antígeno, levando à produção de plasmócitos.

7.1 Plasmócitos de vida longa

Após a ativação com um estímulo apropriado, principalmente o antígeno reconhecido pelo receptor de célula B (BCR), os LB virgens em repouso começam a proliferar (Alinikula & Lassila, 2011). Uma subpopulação dessas células inicia a produção de anticorpos e são chamadas de plasmablastos. Essas células passam por diferenciação terminal nos tecidos, onde continuam a produzir anticorpos e param de proliferar, sendo chamadas de plasmócitos. Os plasmócitos representam o estágio de diferenciação final da linhagem de LB e são células secretoras de anticorpos (ASC, *antibody secreting cells*) profissionais, constituindo o principal ramo da imunidade humoral.

Os plasmócitos não são todos semelhantes. Essas células diferem em seu tempo de vida, rota de diferenciação, natureza da Ig produzida e localização anatômica (Oracki et al., 2010). As vias exatas que resultam nos diferentes tipos de plasmócitos não foram completamente compreendidas, mas sugere-se que dependem do tipo de LB que os

plasmócitos são derivados e do tipo de sinais necessários para estimular sua diferenciação (Fairfax et al, 2008; Oracki et al., 2010).

A diferenciação de células B2 em ASC pode ocorrer em duas rotas principais. As células se diferenciam ao longo da via extrafolicular, originando os plasmócitos de vida curta que produzem anticorpos de baixa afinidade; ou seguem para os centros germinativos (GC), onde há a sustentação da maturação de afinidade do anticorpo e a mudança de classe da Ig, características do plasmócito de vida longa (Paus et al., 2006).

Especialmente nas respostas imunes secundárias, os plasmablastos recém-formados migram para a medula óssea atraídos pela quimiocina CXCL12 (ou SDF-1), derivada das células estromais (Hargreaves et al., 2001; Hauser et al., 2002). As células reticulares estromais da medula óssea fornecem nichos de sobrevivência altamente especializados, onde os plasmócitos continuam a produzir anticorpos por meses ou até mesmo anos (Minges et al., 2002; Radbruch et al., 2006).

Sendo assim, é possível considerar que a migração das ASC para a medula óssea é um mecanismo homeostático, uma vez que os órgãos linfóides periféricos, tais como baço e linfonodos, estarão prontos para montar uma nova resposta quando houver exposição a novos antígenos (Slifka & Ahmed, 1996).

A produção contínua de anticorpos por plasmócitos de vida longa é crucial para a imunidade, porque tais anticorpos fornecem uma proteção imediata sem a necessidade de expansão clonal e diferenciação de LB (Tarlinton, 2006). Evidências indicam que os plasmócitos de vida longa e os de vida curta constituem populações distintas e que nem todos os plasmablastos têm a capacidade de se tornar um plasmócito de vida longa (Radbruch et al., 2006). Esta capacidade depende da expressão do fator de transcrição Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*), porque após a inativação do gene *Prdm1* (que codifica Blimp1), os plasmócitos de vida longa desapareceram da medula óssea, havendo um correspondente decréscimo nas concentrações de anticorpos séricos antígeno-específicos (Shapiro-Shelef et al., 2005).

Slifka et al. (1995) estudaram os sítios anatômicos onde se localizavam os plasmócitos após infecção viral por vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV). A produção máxima de plasmócitos no baço ocorreu 8 dias após a infecção, enquanto que na medula óssea esses níveis não eram detectáveis. Após o término da infecção, houve um declínio de plasmócitos no baço e um aumento progressivo destas células na medula, que se manteve por um ano, indicando que a medula óssea foi o principal sítio anatômico de plasmócitos de vida longa. Manz et al. (1997) mostraram que, 60 dias após o início da resposta imune secundária à

ovoalbumina, mais de 90% dos plasmócitos específicos da medula óssea eram de vida longa e sobreviveram sem proliferar por várias semanas.

Em estudos recentes realizados em nosso laboratório (Cruz et al., 2007), investigamos o desenvolvimento de ASC no baço e na medula óssea de camundongos após receberem 3 doses da vacina cubana VA-MENGO-BC[®] e após a dose reforço. Os resultados indicaram que a medula óssea foi o principal sítio anatômico contendo ASC específicas para MenB e que estas células se mantiveram por pelo menos 2 meses após a imunização primária, indicando a produção de plasmócitos de vida longa. Um achado muito interessante deste estudo foi a correlação positiva entre as cinéticas da resposta de anticorpos bactericidas e de ASC na medula, sugerindo que estas células foram responsáveis pela manutenção dos anticorpos bactericidas no soro.

Outra abordagem tendo a bactéria como agente infeccioso foi investigada por Stenger et al. (2010). Grupos de camundongos receberam uma dose da vacina DTaP (DTP acelular) ou DTP e uma dose reforço 28 dias após a imunização primária. Os autores avaliaram a resposta de ASC de vida longa na medula óssea específicas para alguns antígenos de *Bordetella pertussis*. Houve um aumento significativo do número de ASC na medula óssea após a dose reforço quando comparado com a imunização primária, que se manteve por mais de 1 ano.

Em resumo, sinais específicos parecem ser fundamentais para a formação e manutenção de populações de ASC de vida longa. Os mecanismos que controlam estes processos ainda não foram claramente estabelecidos. Portanto, conhecê-los melhor nos ajudará a desenvolver estratégias de vacinação mais eficientes (Moser et al., 2006).

7.2 Linfócitos B de memória

O segundo “elemento-chave” resultante da resposta imune humoral é a formação dos LB de memória (Nutt & Tarlinton, 2011). Os linfócitos B de memória (LBm) frequentemente possuem receptores de antígeno que sofreram troca de classe e mutação somática, possuem vida longa (anos) e mantêm a habilidade de responder rapidamente após re-exposição ao antígeno se diferenciando em plasmócitos (Tarlinton, 2006; Good-Jacobson & Shlomchik, 2010). Linfócitos B de memória necessitam do contato direto entre os LB ativados e os LT CD4⁺ no centro germinativo (Allen et al., 2007). Uma vez formado, o *pool* de LBm possui um tamanho relativamente estável, embora ainda não tenha sido esclarecido como tal regulação homeostática é alcançada (Nutt & Tarlinton, 2011).

Os mecanismos pelos quais os LBm estão envolvidos na persistência de anticorpos continuam incertos. Em alguns casos, foi observada correlação entre a frequência de LBm circulantes e os níveis de anticorpos (Bernasconi et al., 2002; Crotty et al., 2003), sugerindo que os níveis de anticorpos circulantes são proporcionais ao número total de LBm (Kelly et al., 2006). Bernasconi et al. (2002) observaram correlações positivas entre os níveis de anticorpos específicos e a frequência de LBm após estímulos policlonais. Outros investigadores não encontraram tal relação (Leyendeckers et al., 1999), indicando que a persistência de anticorpos circulantes não é estabelecida pela diferenciação contínua de LBm em plasmócitos de vida curta, mas sim pelos plasmócitos de vida longa, o que suporta a idéia de que a memória sorológica e os LBm representam tipos de memória imunológica controlados independentemente.

Poucos estudos a respeito dos mecanismos de memória gerados após infecção ou imunização contra o meningococo foram realizados. Kelly et al. (2006) avaliaram a persistência de LBm antígeno-específico após imunização com uma vacina conjugada específica para meningococo do sorogrupo C. A vacina conjugada induziu um número significativamente maior de LBm após 7 dias de imunização quando comparada com a vacina polissacarídica. Além disso, um ano após a imunização os LBm persistiram nos indivíduos que receberam a vacina conjugada, indicando a superioridade da vacina conjugada na indução de memória imunológica.

Estudos recentes do mesmo grupo de pesquisadores (Kelly et al., 2008) apresentaram resultados acerca da cinética dos LBm após o esquema primário de imunização com a vacina contra o meningococo C conjugada ao CRM₁₉₇ em crianças menores de 4 meses. Os LBm foram detectados em todos os períodos analisados após a terceira dose (0 a 30 dias). De maneira interessante, a resposta de plasmócitos foi mais demorada após 1 dose quando comparada com o rápido aparecimento dessas células após a terceira dose, indicando a participação dos LBm. Além disso, houve uma correlação significativa entre LBm específicos e os níveis de anticorpos 30 dias após 3 doses.

Luijkx et al. (2008) investigaram uma possível associação entre a presença de atividade bactericida e resposta imune celular (plasmócitos e LBm) após imunização de camundongos com vacinas OMV deficientes nas classes 3 e 4. Essas vacinas contêm os subtipos de PorA P1.7-2,4 e P1.5-1,2-2, sendo o primeiro pouco imunogênico. Os autores demonstraram que a menor atividade bactericida para o subtipo P1.7-2,4 estava associada a maior expansão de LBm e de plasmócitos específicos. Desta forma, enquanto que os títulos de anticorpos funcionais específicos para o subtipo P1.5-1,2-2 continuaram aumentando ao longo

do estudo, paralelamente não houve um aumento de plasmócitos tanto no baço quanto na medula óssea e nem de LBm. Esses resultados sugerem que a qualidade e não a quantidade de plasmócitos ou LBm formados está associada a uma resposta imune mais eficaz, como é o caso da resposta específica ao subtipo P1.5-1,2-2.

Recentemente, Buisman e colaboradores (2009) descreveram as características e a magnitude da resposta de células B de memória antígeno-específicas de vida longa em indivíduos de diversos grupos etários de acordo com o histórico de vacinação contra tétano, coqueluche e sarampo. LBm contra todos os componentes vacinais foram identificados, variando de 0,02% a 0,87% comparados com as células produtoras de IgG total, mesmo em pessoas com baixos títulos de anticorpos séricos. Uma pequena, porém significativa correlação entre os números de LBm específicos e o correspondente título de anticorpos circulantes foi observada para os antígenos vacinais da coqueluche e do sarampo, mas não os do tétano.

Sendo assim, a análise de LBm antígeno-específicos e a sua relação com os anticorpos circulantes poderá ser útil no entendimento da longevidade e estabilidade da resposta imune adquirida após imunização (Buisman et al., 2009).

7.3 A heterogeneidade dos linfócitos T de memória

O processo de formação dos linfócitos T de memória (LTm) se inicia quando o receptor de antígenos de células T (TCR) se liga ao complexo peptídeo-MHC nas células apresentadoras de antígenos (Davis, 1990). Cerca de 90% das células efetoras formadas morrem no decorrer da primeira e segunda semanas, restando apenas uma população residual de células de memória de vida longa. Estas células são predominantemente quiescentes, mas são capazes de se auto-renovar e sobreviver por longos períodos na ausência do antígeno (Seder & Ahmed, 2004).

As células de memória são heterogêneas, propondo-se a existência de pelo menos duas classes (Sallusto et al., 2004). Linfócitos T de memória efetora (T_{EM}) expressam receptores que facilitam sua migração para sítios não linfóides de inflamação (Reinhardt et al., 2001) e produzem uma variedade de citocinas microbidas, incluindo IFN- γ , IL-4 e IL-5, dentro de algumas horas de estimulação do TCR (Pepper & Jenkins, 2011). Os linfócitos T de memória central (T_{CM}) não produzem quaisquer citocinas que são o protótipo da linhagem de células efetoras imediatamente após estimulação do TCR, embora secretem IL-2 e proliferem

extensivamente, adquirindo produção de citocinas efetoras posteriormente. Estas células expressam CD62L (L-selectina) e o receptor de quimiocina CCR7, que estão envolvidos na migração através dos linfonodos e dos órgãos linfóides da mucosa, posicionando-se nas áreas de células T desses órgãos (Cyster, 2005). Foi, então, postulado que os linfócitos T_{CM} circulam através desses locais e provavelmente passam por uma resposta secundária (Sallusto et al., 2004). Tal predição foi confirmada por estudos mostrando que linfócitos T CD4⁺ de memória produtores de IL-2 estão presentes principalmente nos linfonodos, enquanto que os produtores de IFN- γ estão localizados em órgão não-linfóides (Reinhardt et al., 2001).

Na ausência de LTm, a geração de LBm de alta afinidade e a de plasmócitos de vida longa é prejudicada (Crotty et al., 2003). Como descrito anteriormente, os plasmócitos de vida longa residem na medula óssea e os plasmablastos recentemente gerados migram para este sítio e competem com os plasmócitos residentes pelos nichos de sobrevivência fornecidos por células expressando CXCL12. Em contraste, por muitos anos, presumiu-se que os LTm circulavam constantemente pelo corpo em vigilância (Dutton et al., 1998). No entanto, recentemente, Tokoyoda et al. (2009) demonstraram em camundongos que LTm CD4⁺CD44^{hi}CD62L⁻ antígeno-específicos residem na medula óssea, tropismo este mediado pela integrina α 2. Estas células residem na medula óssea em contato com células estromais VCAM-1⁺ expressando IL-7, não proliferam e mantêm baixa ativação da expressão gênica. Quando desafiadas com o antígeno, elas reagem rapidamente e auxiliam na ativação dos LB a produzirem anticorpos de alta afinidade.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo geral

Avaliar, em modelo animal e em humanos, alguns dos mecanismos de desenvolvimento e manutenção da memória imunológica após vacinação contra MenB, utilizando como referência a vacina diftérica (dT ou DTP), considerada ter ótima eficácia em humanos.

8.2 Objetivos específicos

8.2.1 Estudo em camundongos

- × Avaliar a frequência e a distribuição de ASC no baço e na medula óssea dos camundongos imunizados com a vacina VA-MENGOC-BC[®] ou DTP;
- × Analisar a geração e manutenção de LBm após vacinação;
- × Testar o efeito protetor da imunização realizando o desafio infeccioso;
- × Quantificar os níveis de IgG e de anticorpos funcionais (bactericidas e opsonizantes) após imunização;
- × Analisar o efeito de uma dose reforço da vacina tanto em termos de produção de anticorpos como de ativação de linfócitos.

8.2.2 Estudo em humanos

- × Avaliar a cinética da resposta de ASC e LBm em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de voluntários imunizados com diferentes doses da vacina VA-MENGOC-BC[®] ou com a dose reforço da vacina dT;
- × Analisar o desenvolvimento, manutenção e ativação dos LT CD4⁺ de memória através dos marcadores CCR7, CD45RA e CD69;
- × Quantificar os níveis de IgG e de anticorpos funcionais (bactericidas e opsonizantes) após a imunização;
- × Analisar o efeito de uma dose reforço da vacina tanto em termos de produção de anticorpos como de ativação de linfócitos B e T CD4⁺.

9 METODOLOGIA

A metodologia descrita a seguir foi utilizada em modelo animal e os resultados correspondentes serão apresentados na seção referente aos resultados não publicados.

9.1 Ensaio bactericida

Utilizamos o ensaio previamente descrito por Maslanka et al. (1997). Resumidamente, a reação final (50 µl) consistiu de diferentes diluições (25 µl) dos soros testes (previamente inativados a 56°C por 30 minutos) em solução de PBS/BSA, 12,5 µl de soro humano diluído a 1:2 (12,5%) como fonte de complemento e 12,5 µl da suspensão bacteriana (5×10^3 ufc/ml). Após incubação a 37°C por 30 minutos adicionou-se ágar contendo uma mistura de antibióticos (Vancomicina, 3 µg/ml; Colistina, 7,5 µg/ml; Nistatina, 12,5 U/ml; Trimetoprim 5 µg/ml); (VCNT; Difco). Seguiu-se incubação a 37°C por 16h em 5% de CO₂ e as colônias foram contadas em microscópio estereoscópio (40x). O título bactericida foi definido como a recíproca da maior diluição do soro teste resultando em pelo menos 50% de morte bacteriana. Utilizamos como controle positivo um *pool* de soros de camundongos obtidos após a vacinação com a VA-MENGOC-BC[®], cujo título foi previamente determinado. O controle da ativação do complemento pela via alternativa foi feito incubando-se a bactéria e o complemento em solução de PBS/BSA.

9.2 Ensaio de opsonização

9.2.1 Detoxificação das OMVs

Aproximadamente 200 µl de uma suspensão de OMVs de Cu385 diluídas em 800µl de tampão (Tris-HCl 0,1M/EDTA 0,02 mM) foram tratadas com 2% de deoxicolato de sódio (DOC_ Sigma, Nova Zelândia) por 60 minutos a 37°C. Adicionou-se tampão, seguindo-se de centrifugação a 100.000 x g por 2 horas a 4°C. O sedimento foi ressuspenso no mesmo tampão e mantido a -20°C. A quantificação de proteínas totais após o tratamento da amostra foi realizada pelo método de Lowry e a análise qualitativa da concentração de LPS foi feita por TSDS-PAGE (*tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*), descrito previamente por Lesse et al. (1990).

9.2.2 Adsorção das OMVs as *beads* fluorescentes

Utilizamos o ensaio descrito previamente por Lehmann et al. (1997). 500 µl de *beads* (Fluoresbrite, Polysciences, Warrington, PA) marcados com FITC ($4,55 \times 10^{10}$ *beads*/ml) foram centrifugados (15.000 x g/5 min./25°C). Após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso com 450 µl de OMV a 940 µg/ml diluída em tampão borato (ácido bórico a 0,1 M, pH 8,5). Seguiu-se rotação *end-to-end* por 20 horas a 20°C. Após centrifugação, o sedimento foi ressuspenso com 450 µl de BSA (soro albumina bovina) a 2%. Seguiu-se rotação *end-to-end* (1 hora/20°C) e centrifugação. O sedimento foi ressuspenso com 450 µl de solução de estocagem (PBS 0,1 M/5% glicerol/0,02% timerosal/1% BSA; pH 7,4).

9.2.3 Obtenção das células

Cerca de 5 ml de sangue de um voluntário foram coletados em tubo contendo 10 µl de heparina e centrifugados (190 x g/4°C/5 min.). Após descartar o plasma, o conteúdo restante foi distribuído igualmente em 4 tubos cônicos, onde foram adicionados 40 ml de ACK. Seguiu-se centrifugação e lavagem com PBS/BSA (2 vezes). As células foram ressuspendidas com 800 µl de tampão e mantidas no gelo até o momento de uso. A contagem celular foi feita em câmara de Neubauer e a análise da viabilidade celular através da coloração com azul de tripan a uma concentração final de 0,1%.

9.2.4 Reação de opsonização

Cerca de 100 µl das OMVs (extraídas das cepas selvagens ou mutantes) adsorvidas as *beads* fluorescentes ($2,5 \times 10^8$ partículas/ml) foram incubadas por 8 minutos (37°C/rotação *end-to-end*) com 25 µl de soros testes (previamente inativados) acrescidos de 250 µl de tampão. Em seguida, foram adicionados 25 µl de soro humano (1%) como fonte de complemento. Após incubação (8 min./37°C/rotação *end-to-end*), adicionou-se 100 µl de células ($1,25 \times 10^7$ /ml). Seguiu-se incubação e a reação foi parada com 1,5 ml de PBS/EDTA 0,02%. A leitura foi feita em citômetro de fluxo (FACSCalibur).

9.3 Ensaio de proteção

Para os experimentos de proteção, grupos de camundongos foram imunizados com três doses de VA-MENGOC-BC[®] em intervalos de 2 semanas. Foi incluído um grupo controle injetado com NaCl a 0,85%. Duas semanas após a terceira imunização, os camundongos foram usados no ensaio de proteção.

O modelo animal utilizado nos experimentos de proteção foi descrito previamente por Brodeur et al. (1985). Em resumo, foram feitas duas passagens da cepa N44/89 em camundongos antes do desafio bacteriano. Para a inoculação, as bactérias foram removidas do meio TSB/ágar após 20 horas de incubação e ressuspendidas em PBS. A suspensão bacteriana foi ajustada para uma densidade ótica de 0,4 ($\lambda = 590$ nm) e diluída para obter 10^5 ou 10^6 ufc/ml em TSB contendo 4% de mucina (Sigma, St. Louis, USA) e 3% de hemoglobina (Sigma). O número de camundongos sobreviventes foi registrado 24 e 48 horas após o desafio bacteriano.

10 RESULTADOS

10.1 Artigo 1 (estudo em modelo animal): Comparison of long-term humoral memory development after immunisation against *Neisseria meningitis* B or diphtheria toxoid

O ponto de partida para o desenvolvimento da tese de Doutorado foi o trabalho publicado acerca do desenvolvimento de plasmócitos de vida longa após imunização contra MenB em modelo animal (Cruz et al., 2007). Nesse estudo, investigamos o desenvolvimento de ASC no baço e na medula óssea de camundongos imunizados com três doses da vacina cubana VA-MEGOC-BC[®] e uma dose reforço, administrada 2 meses após a última dose do esquema primário de imunização. A resposta humoral contra a cepa vacinal foi avaliada através da determinação dos títulos de anticorpos bactericidas contra a cepa alvo e dos níveis de IgG específicos para OMP. Os resultados indicaram que houve uma resposta persistente de ASC na medula óssea, o que não ocorreu no baço. Em contraste com a resposta de IgG, os níveis de anticorpos bactericidas permaneceram constantes ao longo de todo o estudo. A dose reforço induziu um aumento significativo na frequência de ASC tanto no baço quanto na medula, indicando uma resposta de células B de memória e migração de ASC para a medula.

Continuamos a investigação, acompanhando a resposta induzida por VA-MEGOC-BC[®] por um período maior e com a administração da dose reforço não apenas aos 2 meses após a imunização primária, como também aos 4 e 6 meses, a fim de verificar a longevidade das ASC na medula óssea e a resposta dos LB de memória ao longo do tempo. Como referência de uma vacina eficaz para a geração de memória imunológica, incluímos no estudo a análise da resposta ao TD após imunização com a vacina DTP.

Os resultados demonstraram que as vacinas estudadas induziram diferentes cinéticas da resposta específica de ASC após a imunização primária e após a dose reforço (Cruz et al., 2010). A resposta primária ao TD foi menor que a induzida por MenB, tanto no baço quanto na medula óssea. No entanto, após a dose reforço, a vacina DTP induziu uma resposta muito maior que a vacina VA-MEGOC-BC[®]. Em se tratando da indução de LBm anti-MenB, observamos que o pico da resposta ocorreu após a terceira dose (média = 1,6%), com um ligeiro declínio nos períodos subsequentes, permanecendo em torno de 1% mesmo após as doses reforços. Em contrapartida, a resposta à dose reforço da vacina DTP foi de 1,9%, quase duas vezes maior que a induzida pela vacina VA-MEGOC-BC[®].

Em resumo, os dados obtidos no estudo em modelo animal sugerem que o desenvolvimento de LBm no baço foi o principal mecanismo de memória imunológica de

vida longa induzido pela vacina cubana. Os LBm alcançaram um limiar após a primeira dose da vacina que foi mantido ao longo do estudo, sendo ativado até 6 meses após a imunização primária, gerando uma resposta de anticorpos significativa. Os plasmócitos de vida longa apresentaram diminuição significativa 4 meses após a terceira dose, sendo que as doses *booster* administradas aos 4 e 6 meses não induziram um aumento expressivo destas células na medula óssea. No entanto, estes plasmócitos na medula óssea podem ter sido importantes na manutenção dos níveis de IgG após a imunização primária. Em relação à vacina DTP, os resultados indicaram que plasmócitos e LBm específicos no baço contribuíram fortemente com a resposta de memória celular ao TD. Plasmócitos específicos na medula óssea também representaram um mecanismo de memória imunológica de vida longa induzida por DTP.

Portanto, estes dados indicam que, diferente dos modelos virais, a vacina VA-MENGOC-BC[®] não gerou plasmócitos de vida longa em níveis elevados a partir dos 4 meses após a imunização primária. A fraca resposta celular após o *booster* também indica alguma deficiência no desenvolvimento e/ou reativação dos mecanismos celulares de memória humoral. Por outro lado, a resposta de IgG nos períodos pré e pós-*booster* indicam que os plasmócitos de vida longa e/ou os LBm circulantes, mesmo em concentrações questionáveis, foram elementos importantes na resposta de anticorpos após o *booster*.



Comparison of long-term humoral memory development after immunisation against *Neisseria meningitidis* B or diphtheria toxoid

Simone C. Cruz^a, Giselle P. Silva^a, Felipe J. Sampaio^a, Simone L. Souza^b, Alexandre Alves S.O. Dias^c, Lucimar G. Milagres^{a,*}

^a Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 3º andar, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Patologia e Laboratórios, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto Nacional de Controle de Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2010

Received in revised form 30 July 2010

Accepted 3 August 2010

Available online 15 August 2010

Keywords:

Memory B cell

Vaccine

Neisseria meningitidis

ABSTRACT

Since genome sequence data became available there has been a marked increase in number of protein antigens that have been suggested as prospective vaccine components against *Neisseria meningitidis* B (MenB). Few studies have addressed the mechanisms by which meningococcal vaccines generate and sustain immunological memory. The goal of this study was to compare the B-cell response (antibody-secreting cells [ASC], memory B cell and IgG) evoked by a MenB vaccine (VA-MENGOC-BC®) with the B-cell response to diphtheria toxoid (DT) induced by a successful vaccine (Diphtheria–Tetanus–Pertussis [DTP]). The results showed different kinetics of specific ASC response after the primary and booster immunisations. Concerning the specific ASC kinetics, MenB vaccine induced a strong primary response, but the recall response showed a limited power over time. In contrast, DTP primary ASC response was weaker than the booster responses. We observed an increase in the relative percent of memory B cells after 1, 2 and 3 doses of MenB vaccine (mean of 0.8%, 1.3% and 1.6%, respectively) but without statistical significance. Similar frequencies were detected after boosting given at 4 months (mean of 1.3%) or 6 months (mean of 0.9%) following the third dose. DT specific memory B cell response showed a slight lower magnitude after the primary immunisation schedule (mean of 1.2% after the third dose) compared with the MenB response. However, a stronger memory B cell response was induced by booster doses of DTP vaccine at 4 months (mean of 1.9%) or 6 months (mean of 1.9%). The kinetics of specific IgG induced by both vaccines was similar, suggesting that memory B cells were responsible for the strong antibody response seen after the booster vaccination.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neisseria meningitidis is one of the leading causes of bacterial meningitis and septicaemia in children worldwide and a cause of more than 50,000 deaths a year [1]. Effective polysaccharide-based vaccines against serogroup A, C, Y and W135 meningococci are available, but there is currently no universal vaccine against serogroup B (MenB) [2]. Tailor-made wild-type OMV vaccines are used today for controlling outbreaks dominated by phenotypically highly related MenB strains belonging to the same clonal complex [3].

Killing of MenB can result from complement-mediated serum bactericidal activity or opsonophagocytosis, or a combination of both mechanisms [4]. Establishment of immunological memory is a hallmark of adaptive immune responses and the biological mechanism for the success of vaccines [5]. Immunological memory is comprised of a cellular and humoral component. Soluble antibodies maintain a first line of defence against extracellular pathogens both systemically and at mucosal surface and are recognised as serological memory [6]. The cellular components of long-term humoral memory are sustained by the existence of quiescent memory B cells and long-lived plasma cells or antibody-secreting cells (ASC) [7,8]. Understanding the mechanism by which meningococcal vaccines generate and sustain the serological and cellular immune memory is essential to improving the long-term efficacy of MenB vaccines.

Among several bacterial vaccines used in childhood immunisation, diphtheria–tetanus–pertussis vaccine (DTP) has produced a dramatic decline in the incidence of diphtheria all over the world [9,10]. After primary immunisation in the first year of life, booster

* Corresponding author at: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Dpto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, 3º andar, Vila Isabel, CEP: 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 021 2587 6380; fax: +55 021 2587 6476.

E-mail address: lucimar@uerj.br (L.G. Milagres).

doses are recommended at 5–6 years of age and every subsequent 10 years [10,11].

In the present study, we used this successful vaccine (DTP) and the B cell response to diphtheria toxoid (DT) as a reference for our analysis of the development of long-term humoral memory induced by the VA-MENGOC-BC®, the Cuban outer membrane vesicle vaccine against MenB.

We have previously shown the generation of a consistent MenB-ASC response in bone marrow of mice immunised with the Cuban MenB vaccine. These cells remained at significant levels up to 2 months after the third dose of the vaccine [12]. In the present study we analysed the maintenance of MenB-ASC in bone marrow for extended periods of time after immunisation as well as the development of memory B cells. The effect of booster doses on B cell response was also investigated. Similar analyses of humoral immunity to DT were done after triple DTP immunisation.

The results showed that the vaccines in study induced different kinetics of specific ASC response after the primary and booster immunisations. Based on the ASC arm of humoral memory (long-lived plasma cells), DTP vaccine induced a longer-lasting memory than MenB vaccine. Similarly, development of long-term memory B cell was stronger after DTP vaccination.

2. Materials and methods

2.1. Serogroup B meningococcal strain

The Cuban vaccine strain (Cu385/83) of serotype:serosubtype:immunotype 4,7:P1.19,15:L3,7,9 was used for the preparation of outer membrane vesicles (OMV) to be used as the coating antigen for the ELISA.

2.2. Vaccine and immunisation of mice

The VA-MENGOC-BC® was obtained commercially. Diphtheria vaccine (DTP) was produced by Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. Five- to six-week-old female Swiss mice in groups of a mean of 10 were immunised with 3 intramuscular injections of vaccine, 2 weeks apart. Each MenB vaccine injection (100 µl) contained 2 µg of OMPs, 2 µg of C polysaccharide, 400 µg of Al(OH)₃ and 0.01% of thimerosal as preservative [13]. DTP vaccine injection (100 µl) contained 2 µg of diphtheria toxoid, 2 µg of tetanus toxoid, 28 OP/ml of whole cells of *Bordetella pertussis*, 500 µg of Al(OH)₃ and 80 µg of thimerosal.

Serum samples of a group of mice was obtained before and 14 days after each injection of vaccine during the primary immunisation schedule (total of 3 injections) and at 2, 4 and 6 months after the third dose (pre-booster sera). Blood was collected 14 days after the booster dose given to different groups of mice at 2, 4 and 6 months. Serum samples were stored at –20 °C.

For ELISPOT and memory B cell assay, spleen and bone marrow cells were collected from different groups of mice before and after each immunisation following similar schedule to the one described above.

2.3. ELISPOT assay

Single cell suspensions of splenocytes or femur bone marrow were cleared of erythrocytes by a single round of 0.8% NH₄Cl treatment and suspended in RPMI (HyClone, Utah, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 5 × 10^{–5} M β-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, USA) and antibiotics (10,000 U/ml penicillin (Sigma, St. Louis, USA) and 10 mg/ml streptomycin (Proquímios, Rio de Janeiro, Brazil)). Cells were then quantified by ELISPOT technique as previously described [12]. Briefly, 96-well Maxisorp plates (Nunc, Rochester, USA) were

coated either with 2 µg/ml of goat anti-mouse IgG monoclonal antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA), or 4 µg/ml of OMV (Cu385 strain) or diphtheria toxoid (Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) in 0.05 M Tris buffer, pH 9.5, overnight at 4 °C. After washing with phosphate buffer saline (PBS) 0.01 M, pH 7.2–7.4, plates were blocked with RPMI supplemented with 1% fetal bovine serum and antibiotics (150 µl/well). Spleen cells at concentrations of ~1 × 10⁷/100 µl and bone marrow cells (~1 × 10⁶/100 µl) were added to the first well and serial 2-fold dilution was made in RPMI complete medium. Plates were incubated for 16 h at 37 °C/5% CO₂ and then washed with PBS/1% Tween 20 (T20). Secreted IgG was detected with goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase-conjugated mAb (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA) at a dilution of 1:2000 in PBS/1% BSA/0.1% T20. ELISPOTs were developed with 1 mg/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP; Sigma) dissolved in amino-methyl-propanol buffer (Sigma). Spots were counted after 2 h by stereoscopic microscopy.

Mean values of spots were calculated from triplicates. OMV or diphtheria specific ASC levels were expressed as a percent of total IgG-secreting B-cells.

2.4. Memory B lymphocyte

An amount of 2 × 10⁶ splenocytes/100 µl were cultured for 3 days in complete medium in the presence of *Staphylococcus aureus* cells (Cowan 1) SAC (Calbiochem, USA) diluted 1:5000 and 100 IU/ml interleukin-2 (Calbiochem, USA) [14]. Cells were then washed and quantified by ELISPOT technique described in 2.3.

2.5. ELISA

Outer membrane proteins (OMP) coating antigen was prepared by extraction of OMVs from the wet cell pellet for 2.5 h at 50 °C with 5 ml of 0.2 M lithium chloride in a 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.8) per g of cells [15]. Diphtheria toxoid was provided by Instituto Butantan, São Paulo. ELISA analysis was performed, as previously described [16], with a peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA). As an internal antibody standard for IgG determination, a 2-fold dilution series of a pool of positive post-vaccination sera, assigned 1000 units per milliliter (U/ml), was used in all ELISA experiments. The mean value of the observed optical density was transformed into arbitrary U/ml by a sigmoidal curve (four-parameter logistic log transformation) calculated from the values of the standard serum using an ELISA program [17].

2.6. Statistical analysis

The levels of significance of the differences between groups were examined by paired or unpaired *t* test (parametric tests). These analyses were performed with a GraphPad-Prism software, version 4.02. *P* < 0.05 was taken as significant.

3. Results

3.1. Relative concentration of ASC specific to MenB (MenB-ASC) after immunisation

Fig. 1A shows the percent of ASC specific to OMP of a B:4,7:P1.19,15 strain relative to total IgG-secreting cells detected in bone marrow and spleen of mice immunised with one, two and three doses of VA-MENGOC-BC® vaccine.

We did not detect any MenB-ASC before immunisation either in spleen or bone marrow (data not shown). After 1 or 2 vaccine injections, MenB-ASC was detected in similar frequency in spleen and bone marrow (Fig. 1A). However, the third vaccination induced

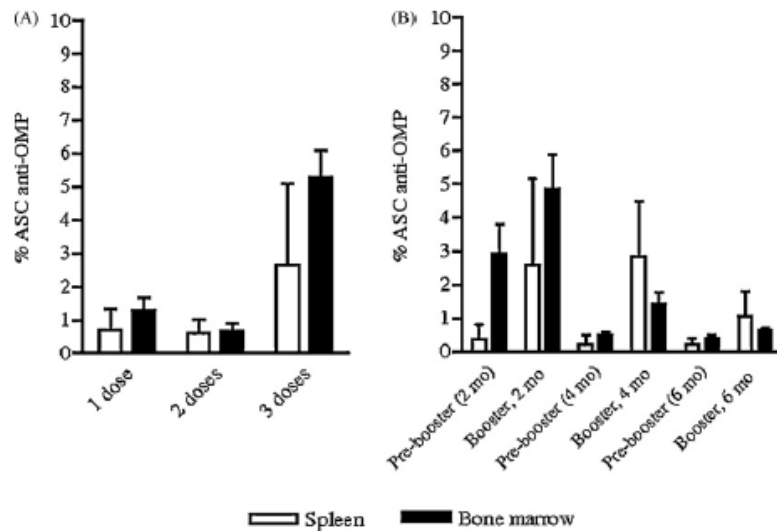


Fig. 1. ASC (ELISPOT) response to MenB:4,7:P1,19,15 strain (Cu385/83) of mice immunised with one, two or three doses of the VA-MENGOC-BC® vaccine. Cells were collected 14 days after each vaccine injection. Each time point represents an independent group of animals. Mean values of ASC frequencies as percent of total IgG-ASC detected in spleen (white bars) and bone marrow (black bars). (A) After primary immunisations, (B) before and after booster injections given at 2, 4 and 6 months post-third dose. The data show the average and standard error of a mean of 11 mice per group.

a significant increase of specific ASC, which was higher ($P=0.06$) in bone marrow (mean of 5.3%) compared with spleen (mean of 2.6%). An important but not significant decline (about 1.8-fold) of specific ASC was observed in bone marrow 2 months (mean of 2.9%, Fig. 1B) after the third dose of vaccine. Overall, the frequency of specific ASC in bone marrow detected between 4 and 6 months was about 0.5% and similar ($P>0.05$) to ASC measured after 1 or 2 doses of the vaccine.

In contrast to the bone marrow, the decrease of spleen MenB-ASC was a maximum of 2.8-fold, 2 months after the third dose (Fig. 1B). At this time, the frequency of MenB-ASC in spleen (mean of 0.36%) was about half the frequency detected after the first dose (0.71%, $P>0.05$, Fig. 1A).

As shown in Fig. 1B, a booster dose administered 2 months after the third dose, induced a significant increase in specific ASC levels in spleen (mean of 2.6%; $P<0.01$, compared with pre-booster), reaching similar frequency as detected after the third dose. Since the pre-booster ASC levels in bone marrow were still high at 2 months (mean of 2.9%) the booster dose induced a small increase in ASC levels, but reached similar frequency (mean of 4.9%) as detected after the third dose (mean of 5.3%, Fig. 1A).

In comparison with ASC levels before booster, the 4-month booster dose applied in a second group of animals induced a significant ASC response in spleen (mean of 2.8%; $P<0.01$) but not in the bone marrow (mean of 1.4%; $P=0.06$) (Fig. 1B). An even lower ASC response was evoked after the 6-month booster injection either for spleen (mean of 1.1%, $P<0.05$, compared with pre-booster) or bone marrow (mean of 0.6%, $P=0.21$, compared with pre-booster, Fig. 1B). These data indicate that a small fraction (about 0.5%) of MenB-ASC (long-lived ASC) remained in bone marrow up to 6 months post-vaccination. Despite this low frequency, bone marrow long-lived ASC may be important to maintain IgG levels in the blood. There is also a suggestion that in terms of spleen and bone marrow MenB-ASC response, booster injections of MenB vaccine have a limited effect over time after the primary immunisation.

3.2. Relative concentration of ASC specific to diphtheria toxoid (DT-ASC) after immunisation

Fig. 2A shows a weaker primary DT-ASC response when compared with the primary MenB-ASC response induced by the Cuban

vaccine (Fig. 1A). After the second immunisation, the frequency of DT-ASC in spleen was higher (mean of 0.8%) compared with the bone marrow (mean of 0.2%) but without statistical significance. However, after triple immunisation, bone marrow levels of DT-ASC reached a maximum of 1% and was very close to the amount recorded in spleen (mean of 1.2%, $P=0.45$).

About 4 months following the third dose, there were no significant changes in ASC frequency in bone marrow or spleen. Nonetheless, DT-ASC frequency in spleen showed a significant drop 6 months after the third dose, while the bone marrow ASC levels had a small decrease in the same period (Fig. 2B, pre-booster 4 and 6 months). As seen in Fig. 2A and B, a typical memory immune activation occurred after the booster injections of DTP vaccine given at 4 or 6 months after the primary schedule. Noteworthy is that after boosting the ASC, frequencies in spleen were 2–3 times higher than the frequencies in bone marrow (Fig. 2B). The booster ASC response measured in spleen 4 months (mean of 7.2%) and 6 months (mean of 8%) after the third dose, was significantly higher than the booster ASC response measured after three doses (mean 1.2%). A significant increase in DT-ASC in bone marrow was also seen after the 4-month (mean of 2.1%) and 6-month (mean of 3%) boosting compared with the frequency of cells detected after the third dose (mean of 1%). Considering that most of the ASC induced by booster injection comes from the differentiation of memory B cells, these results suggest that DTP vaccine induced a longer-lasting memory than MenB vaccine. In addition, the booster DT-ASC response (mean of 1.8–3%) in bone marrow was higher than the ASC frequencies detected after the primary immunisation (mean of 0.2–1.0%).

Therefore, these data indicate that the MenB and DT vaccines have different mechanisms to evoke and maintain the immunological memory to the protein components of each vaccine.

3.3. Specific memory B cell response to MenB and DT

Fig. 3A shows the percent of specific memory B cells detected as specific ASC after *in vitro* stimulation of spleen memory B cells for 3 days. The results showed a small increase ($P>0.05$) in the relative percent of memory B cells after 1, 2 and 3 doses of MenB vaccine (mean of 0.8%, 1.3% and 1.6%, respectively). There were no significant changes in the numbers of memory B cells detected at 2 months (mean of 1.1%, data not shown) and 4 months (mean

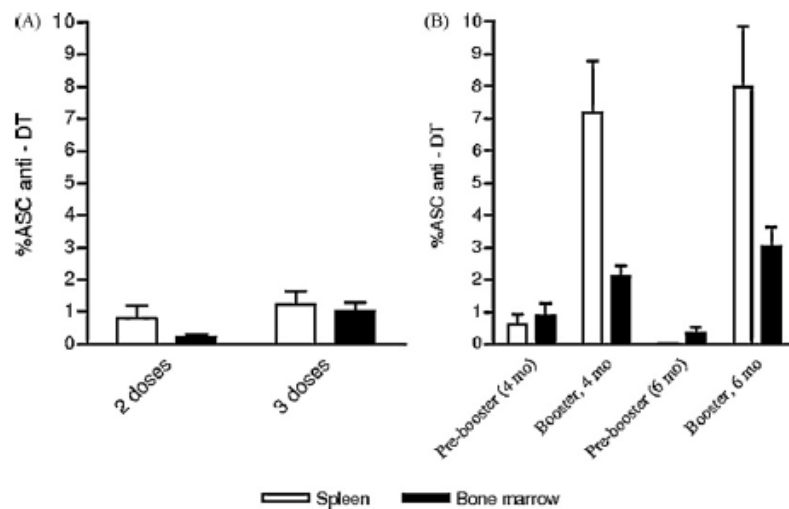


Fig. 2. ASC (ELISPOT) response to diphtheria toxoid (DT) of mice immunised with two or three doses of the DTP vaccine. Cells were collected 14 days after each vaccine injection. Each time point represents an independent group of animals. Mean values of ASC frequencies as percent of total IgG-ASC detected in spleen (white bars) and bone marrow (black bars). (A) After primary immunisations, (B) before and after booster injections given at 4 and 6 months post-third dose. The data show the average and standard error of 8–9 mice per group.

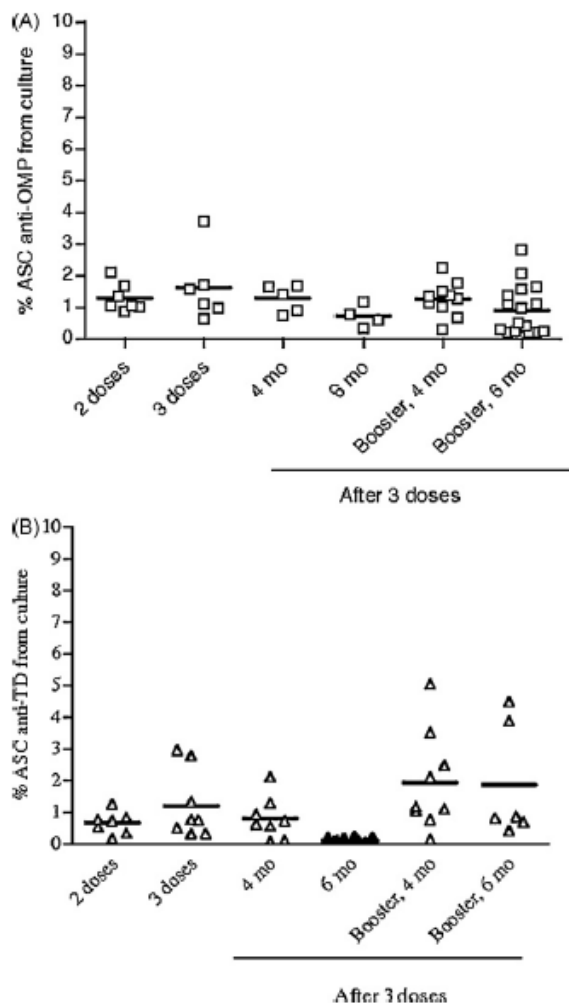


Fig. 3. Frequencies of specific ASC from culture (memory B cell) against OMV of MenB (A) and diphtheria toxoid (DT) (B). Memory B cells were detected as specific ASC after *in vitro* stimulation of spleen memory B cells for 3 days. The data show the average of 4–10 mice per group.

of 1.3%) compared with the frequency measured after the third immunisation. A decrease of memory B cells was seen 6 months (mean of 0.7%) after the last vaccine injection but without statistical significance.

Similar to the ASC response, the booster injections of vaccine given at 4 or 6 months did not induce a significant increase of memory B cell frequency (mean of 1.3% and 0.9%). After statistical analyses of all data generated in this study, we observed a strong positive correlation between spleen ASC and memory B cells ($r = 0.81$, $P = 0.05$) but not between bone marrow ASC and memory B cells ($r = 0.58$) after the third immunisation. A significant positive correlation ($r = 0.7$, $P = 0.016$) between spleen ASC and memory B cell was seen after the 4-month booster, but not after the 6-month booster ($r = 0.29$, $P = 0.25$).

Therefore, these data indicates that an important memory B cell response was readily induced with one dose of vaccine. Nonetheless, the second and third doses of vaccine may have been important to induce a homeostatic level of about 1% of specific spleen memory B cells.

Concerning the DT specific memory B cell response, we observed a lower magnitude after the primary immunisation schedule compared with the MenB response. The frequency of DT-memory B cell after 3 doses (mean of 1.2%) was similar to the one evoked by two doses of MenB vaccine (mean of 1.3%) (Fig. 3A and B). A great ($P < 0.05$) decrease of DT-memory B cell frequency was detected 6 months after the third dose of the DT vaccine, distinguishing from the stable memory B-cell response induced by MenB vaccination (Fig. 3B). However, a significant increase of B-cell memory frequency was seen after booster immunisation at 2 months (mean of 1.0%, data not shown), 4 months (mean of 1.9%) or 6 months (mean of 1.9%) following the primary immunisation (Fig. 3B). Thus, a stronger memory B cell response was induced by booster doses of DTP vaccine compared with MenB vaccine. A significant positive correlation was observed between spleen ASC and B cell memory after the 2-month booster ($r = 0.79$, $P = 0.0189$) or 4-month booster ($r = 0.81$, $P = 0.0076$), but not after the 6-month booster injection of DTP vaccine (data not shown).

3.4. IgG response to MenB and DT

Serum IgG response of immunised mice to OMP (Cu385/83 strain) was dose-dependent (Fig. 4A). One dose of vaccine induced

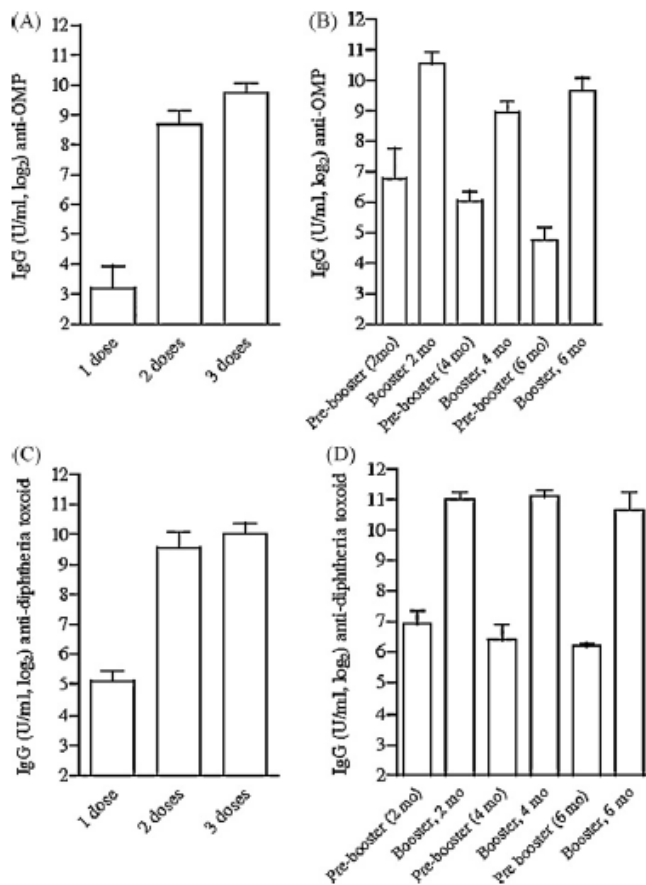


Fig. 4. Serum antibody response to MenB:4,7:P1,19,15 strain (Cu385/83) of mice immunised with VA-MENGOC-BC® vaccine (A, B) and to diphtheria toxoid of mice immunised with DTP vaccine (C, D). The data show the average and standard error of serum IgG levels (U/ml) detected by ELISA 14 days after each vaccine injection during the primary immunisation schedule (A, C), before and 14 days after booster injections given at 2, 4 and 6 months after the primary immunisation schedule (B, D). Data correspond to 5–10 mice per group.

a strong immunological memory as seen by the large increase in antibody levels after the second dose (5.6-fold increase, $P < 0.01$). The third dose did not induce a great increment in IgG anti-OMP (log₂ mean of 9.7) compared with the second dose of vaccine.

Two months after the third dose of vaccine there was a significant decline ($P < 0.01$) in antibody levels (log₂ mean of 6.8, Fig. 4B) and a gradual decline in the subsequent periods (log₂ mean of 6.1 and 4.8 at 4 and 6 months post 3 doses, respectively, Fig. 4B).

A booster dose, injected at 2, 4 or 6 months after the primary immunisation schedule, induced about a 4-fold increase ($P < 0.05$) in specific IgG levels (log₂ mean of 10.5, 8.9 and 9.6, respectively, Fig. 4B), reaching similar levels to that one observed 14 days after the third dose.

DTP vaccine induced the same pattern of IgG response to DT (Fig. 4C and D) as described above for MenB. There were no great differences in DT-IgG levels if the booster dose was applied at 2, 4 or 6 months after the third immunisation (Fig. 4D).

For both vaccine there were no significant correlations between IgG levels and ASC or memory B cell frequencies.

4. Discussion

Despite important progress in MenB vaccine research over the last few years [2,3], only OMV vaccines have been used to disrupt clonal outbreaks [18]. Since the 1960s, the induction of bactericidal antibodies, mainly to homologous strains, has been the immuno-

logical surrogate for protection against meningococcal disease [19]. In general, the capacity of MenB vaccines to generate immunological memory has been studied by measuring antibodies after a booster vaccination [20]. Further understanding of the mechanism by which MenB vaccines generate and sustain antibody response is likely to lead to both a more rational choice of vaccine formulations and/or schedules to provide more sustained protection, since immunised individuals may eventually become infected with MenB [21,22]. The contribution of B cells to immunological memory encompasses two distinct populations of cells that are generated during primary immune responses, long-lived plasma cells (in this study referred as ASC), which continue to secrete high levels of immunoglobulin for protracted periods of time well after antigen clearance, and memory B cells, which can rapidly proliferate and differentiate into plasma cells following recurrent exposure to the initial immunising antigen, thereby simultaneously increasing the precursor frequency of antigen-specific memory B cells and enriching the pool of antigen-specific immunoglobulin [6,8].

The data presented here confirmed our previous results [12], demonstrating that in comparison with spleen, bone marrow was the anatomical site which showed higher relative frequency of MenB-ASC after the primary immunisation schedule. Nonetheless, an important reduction in bone marrow MenB-ASC response was detected 2 months later continuing at 4 and 6 months after the third dose. At these times there were no differences between specific ASC response in spleen and bone marrow and the responses were similar to that one detected after 1 or 2 doses of the vaccine. These data differ from a report using a viral infection model which showed that after clearing the infection and for the life of the mouse, the bone marrow contains >90% of virus-specific plasma cells [8].

We then analysed the effect on ASC levels of a booster injection of VA-MENGOC-BC® given at different times after the primary immunisation. For spleen specific ASC levels, booster doses injected up to 4 months after the third dose of vaccine induced a response similar to the one evoked by triple immunisation, indicating the activation of specific memory B cells and consequent differentiation into ASC. In contrast, an inverse correlation was seen between time of boosting and ASC levels in bone marrow, suggesting differences in bone marrow homing capacity of ASC generated after boosting. It is noteworthy that mice did not mount a significant ASC response following the 6-month booster injection, either in bone marrow or in spleen. The reasons for that are not known but it may be related to the vaccine antigens since a typical booster response could be detected after DTP booster injections, even at 6 months after the primary immunisation.

The primary and booster cellular response induced by the DTP vaccine was quite different from the ASC response induced by the MenB vaccine. The primary ASC response to DT was much lower, either in spleen or bone marrow, than the primary cellular response to MenB. In contrast, the booster response induced by DTP vaccine at 4 or 6 months (but not at 2 months) was much higher than the MenB vaccine induced cellular response. We do not know the cause for these differences, but it is important to consider that the MenB vaccine is composed basically of outer membrane proteins and residual lipooligosaccharide in the form of OMV. DTP vaccine used in this study is formulated with secreted proteins and whole cells of *Bordetella pertussis*, a Gram-negative bacterium. Lipopolysaccharide is a potent activator of B cells and exhibits a pro-survival activity in both immature and mature B cells through NF- κ B activation and prevention of mitochondrial translocation of Bax, a pro-apoptotic protein of the Bcl2 family [23]. A question remains if the distinct presentations of this molecule as a component of the two vaccines in study could have distinct effects *in vivo*.

The relative memory B cell response anti-MenB detected in spleen reached its peak (mean of 1.6%) after the third immunisation. It had a small decrease thereafter but remained at about 1%

even after the booster doses. Although we did not find a important increment in spleen and bone marrow cellular response (memory B cell and/or ASC) anti-MenB after the booster dose administered 6 months following the third injection of vaccine, the antibody response was markedly increased and reached similar levels to those detected after the third dose. These data suggest that spleen memory B cells, which remained at constant levels during the whole study, were responsible for the strong antibody response seen after the booster vaccination. Accordingly, Blink et al. [24] showed that the numbers of circulating memory B cells remained constant from early on in the immune response, although the affinity of their antibodies increased. It is noteworthy that we did not study lymph nodes from vaccinated animals, raising questions about the possibility of other secondary lymphoid organs constituting an additional reservoir for long-lived memory B cells.

A human study showed that a fourth dose of the Norwegian MenB vaccine given 10 months after the primary immunisation (3 injections) induced a higher bactericidal antibody response than the one seen after the primary immunisation. The subsequent decline of antibody levels was slower than after the third dose, resulting in a longer-lasting response. By using an animal model, in the present study, we observed that the two vaccines in analysis induced different ASC response after the primary immunisation and also after boosting. However, less pronounced differences were seen for the generation and maintenance of memory B cells and the IgG response. We do not know the exact implications of these findings for human vaccinology but since the efficacy of OMV vaccines is still unsatisfactory, additional studies should be conducted in humans.

Concerning DTP vaccine, we highlight the increase in memory B cell response with the booster doses administered as late as 6 months after the primary immunisation. This was seen directly by measuring B cell memory frequencies and indirectly through the ASC levels detected in spleen after boosting. The mean of B cell memory frequencies after the booster doses (given at 4 and 6 months) was about 1.9% for DTP vaccine and 1.1% for MenB vaccine. Together with the DT-ASC response in spleen which showed higher frequencies after boosting compared with the response induced by the third dose, these data suggest that the spleen is a major reservoir for long-lived memory B cells specific for DT. In addition, the booster DT-ASC response in bone marrow was higher than the ASC frequencies detected after the primary immunisation, indicating a gradual increase in the frequency of ASC migrating from spleen to bone marrow. Although we could not compare the amount of specific IgG induced by each vaccine, we observed that the kinetic of DT-IgG response was similar to the MenB-IgG.

This study showed no significant correlations between IgG concentrations and ASC or memory B cells, suggesting that antibody studies should not be the only marker of vaccine efficacy.

In conclusion, data of this study suggest that spleen memory B cells were an important mechanism of long-term immunological memory induced by the Cuban vaccine. It seems that these cells reached a threshold value after one dose of vaccine which was maintained throughout the study and could be activated as long as 6 months after the primary immunisation generating a significant antibody response. Although in small frequency, bone marrow long-lived ASC might be important for the maintenance of IgG levels after primary immunisation. Concerning the DTP vaccine, our data indicated that specific ASC and memory B cell in spleen strongly contributed to the cellular memory response to the DT. Bone marrow DT-ASC was also present as a mechanism of long-term immune memory induced by DTP vaccination.

Altogether, these data suggested that spleen long-lived memory B cells is an important mechanism of humoral memory induced by vaccination against meningococci and diphtheria toxoid. It remains unknown which factors control the magnitude and duration of the

ASC and LBm responses and the relationship between these cells. Further studies should be designed to evaluate the effect of antigen composition of MenB vaccine on the mechanisms of development of immune memory cells.

Acknowledgements

We acknowledge FAPERJ, SR2-UERJ, CAPES and CNPq for financial support. We are thankful to Dra Marta Tanizaki, Instituto Butantan, São Paulo, for providing the diphtheria toxoid.

References

- [1] Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcal sepsis, and *Neisseria meningitidis*. Lancet 2007;369:2196–210.
- [2] Feavers IM, Pizza M. Meningococcal protein antigens and vaccines. Vaccine 2009;27S:B42–50.
- [3] Sadarangani M, Pollard AJ. Serogroup B meningococcal vaccines – an unfinished story. Lancet Infect Dis 2010;10:112–24.
- [4] Plested JS, Granoff DM. Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. Clin Vaccine Immunol 2008;15:799–804.
- [5] Wrammert J, Miller J, Akondy R. Human immunity memory to yellow fever and smallpox vaccination. J Clin Immunol 2009;29:151–7.
- [6] Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. Eur J Immunol 2009;39:2065–75.
- [7] Manz RA, Thiel A, Radbruch A. A lifetime of plasma cells in the bone marrow. Nature 1997;388:133–4.
- [8] Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity 1998;8:363–72.
- [9] Galazka AM. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. J Infect Dis 2000;181:S2–9.
- [10] Brazil. Ministério da Saúde. Portaria n (597/GM, de 08 de abril de 2004. Institui em todo território nacional, os calendários de vacinação. Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]. Brasília, 12 de abril de 2004. Seção 1. 69:47.
- [11] Fundação Nacional de Saúde–Funasa. Difteria: situação atual da doença; 2002. <http://www.funasa.gov.br/guia-epi/htm/doencas/difteria/index.htm> [accessed 23.04.2009].
- [12] Cruz SC, Cruz AC, Oliveira JM, Soares AM, Gioia CA, Milagres LG. Generation of long-lived plasma cells to serogroup B *Neisseria meningitidis* after murine immunisation with an outer membrane protein vaccine. Vaccine 2007;25:5046–52.
- [13] Sierra VGG, Campa CH, García LI, Sotolongo FP, Izquierdo LP, Valcarcel LM, et al. Efficacy evaluation of the Cuban vaccine VA-MENGOC-BC® against disease caused by serogroup B *Neisseria meningitidis*. In: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiesen B., editors. *Neisseria 1990*. Berlin: Walter de Gruyter; 1991. p. 129–34.
- [14] Nanan R, Heinrich D, Frosch M, Kreth HW. Acute and long-term effects of booster immunisation on frequencies of antigen-specific memory-B lymphocytes. Vaccine 2002;20:498–504.
- [15] Tsai CM, Frasch CE. Chemical analysis of major outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: comparison of serotypes 2 and 11. J Bacteriol 1980;141:169–76.
- [16] Milagres LM, Ramos SR, Sacchi CT, Melles CEA, Vieira VSD, Sato H, et al. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. Infect Immun 1994;62:4419–24.
- [17] Plikaytis BD, Holder PF, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual, Version 2.01. Atlanta, GA, USA: Centers for Disease Control and Prevention; 2002.
- [18] Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, et al. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. Vaccine 2009;27S:B3–12.
- [19] Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. J Exp Med 1969;129:1307–26.
- [20] Feiring B, Fuglesang J, Oster P, Naess L, Helland O, Tilman S. Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. Clin Vaccine Immunol 2006;13:790–6.
- [21] Wedge E, Hoiby EA, Rosenqvist E, Bjune G. Immune response against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccinees and controls who contracted meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. Infect Immun 1998;66:3223–31.
- [22] Milagres LM, Gorla MCA, Rebelo MC, Barroso DE. Bactericidal antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup B in patients with bacterial meningitis: effect of immunisation with an outer membrane protein vaccine. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;28:319–27.
- [23] Souvannavong V, Saidji N, Chaby R. Lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* activates NF- κ B through both classical and alternative pathways in primary B lymphocytes. Infect Immun 2007;75:4998–5003.
- [24] Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. J Exp Med 2005;201:545–54.

10.2 Resultados complementares em modelo animal (não publicados)

Além dos resultados publicados no Artigo 1 (Cruz et al., 2010), o estudo em modelo animal culminou na análise dos anticorpos funcionais (bactericidas e opsonizantes) após imunização com a vacina VA-MENGOC-BC[®]. Os grupos de camundongos estudados foram os mesmos que aqueles apresentados no Artigo 1.

10.2.1 Resposta de anticorpos bactericidas

A Figura 1 apresenta a média e o erro padrão dos títulos de anticorpos bactericidas ($\log_2$) induzidos por diferentes doses da vacina VA-MENGOC-BC[®] nos mesmos grupos de animais que foram sacrificados para o ensaio de ELISPOT (artigo 1).

A resposta de anticorpos bactericidas foi dose-dependente (Figura 1A). A segunda dose da vacina induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) dos títulos de anticorpos bactericidas (média = 3,43) quando comparados com a primeira dose (média = 1,00). Houve um aumento importante dos títulos de anticorpos bactericidas 14 dias após a terceira dose (média = 5,17), com declínio gradual nos períodos subsequentes (especialmente 4 e 6 meses após 3 doses ($P < 0,05$); Figura 1B), atingindo níveis similares aos resultados induzidos pela primeira dose da vacina. As doses *booster*, administradas 4 ou 6 meses após a terceira dose, resultaram em aumento significativo dos anticorpos bactericidas, alcançando concentrações similares às detectadas após a imunização primária (média = 5,2 e 6,1, respectivamente; Figura 1B). Porém, quando a dose reforço foi administrada 2 meses após a imunização primária (média = 4,5), não observamos um aumento significativo, já que os títulos de anticorpos bactericidas permaneceram elevados (média = 3,6) dois meses após a terceira dose.

Apesar da resposta significativa de anticorpos bactericidas induzida por 3 doses da vacina VA-MENGOC-BC[®], os resultados de proteção ao desafio infeccioso demonstraram proteção parcial (45,6%) contra a infecção por Men B (10^5 ufc/ml, cepa N44/89) comparado com o grupo salina (20%), indicando a falta de correlação entre os ensaios *in vivo* e *in vitro* (dados não mostrados).

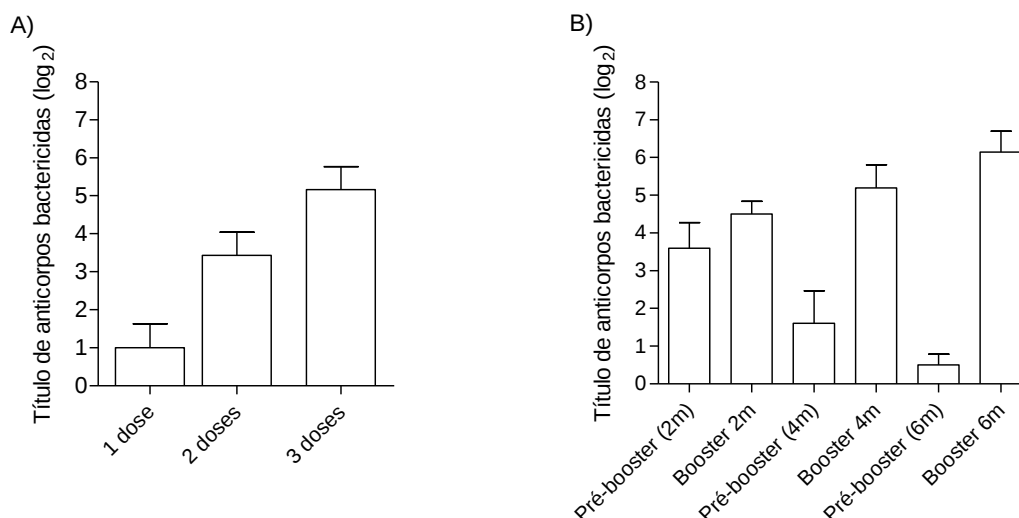


Figura 1 – Títulos de anticorpos bactericidas (log₂) contra a cepa B:4,7:P1.19,15 em camundongos vacinados com diferentes doses de VA-MENGOC-BC[®]. As amostras foram coletadas 14 dias após cada dose do esquema primário de imunização (A), antes e 14 dias após as doses *booster*, administradas 2, 4 e 6 meses após a imunização primária (B). As barras representam a média e o erro padrão de 5-10 animais por grupo.

10.2.2 Resposta de anticorpos opsonizantes

A Figura 2 apresenta a resposta de anticorpos opsonizantes contra a cepa vacinal medida através da emissão de fluorescência induzida durante o *burst* oxidativo dos neutrófilos.

De forma similar à resposta de anticorpos bactericidas, após a segunda dose da vacina (Figura 2A), houve um aumento significativo ($P < 0,001$) da emissão de fluorescência (mediana = 2054) quando comparada com 1 dose (mediana = 217). A terceira dose da vacina induziu aumento significativo (mediana = 2853) de anticorpos opsonizantes em comparação com a segunda dose. Nos períodos subsequentes (4 e 6 meses após a terceira dose; Figura 2B), houve um declínio gradual da emissão de fluorescência (mediana = 348 e 241, respectivamente). As doses *booster* (4 e 6 meses) induziram respostas similares (mediana = 2362 e 2054, respectivamente), significativamente maiores ($P < 0,001$; 4 e 6 meses) que o *pré-booster* (Figura 2B). Não observamos um aumento significativo quando a dose reforço foi administrada 2 meses após a imunização primária (mediana = 1590) porque os níveis de anticorpos opsonizantes permaneceram elevados (mediana = 987) dois meses após a terceira dose. De maneira interessante, o perfil da resposta de anticorpos opsonizantes e o dos títulos

de anticorpos bactericidas apresentaram uma forte correspondência em todos os períodos analisados.

Com o intuito de investigar o papel das proteínas PorA e Opa na resposta de anticorpos opsonizantes, foram utilizadas as OMPs das cepas H355 (PorA homóloga à cepa vacinal) e suas variantes (PorA⁻ e Opa⁻). Como apresentado na Figura 2C, respostas similares de anticorpos foram detectadas para ambas as cepas P1.19,15 (Cu385 e H355; mediana = 2853 e 2189, respectivamente). Em relação às cepas mutantes, foi possível observar um declínio significativo ($P < 0,001$) na resposta de anticorpos quando PorA⁻ (média = 542), mas não Opa⁻ (média = 2295), foi usada como cepa alvo, indicando um papel importante de PorA na indução de anticorpos opsonizantes.

Figura 2 – Resposta de anticorpos opsonizantes avaliada como a emissão da fluorescência induzida durante o *burst* oxidativo dos neutrófilos. A e B) Contra a cepa vacinal (Cu385/83); as amostras foram coletadas 14 dias após cada dose do esquema primário de imunização (A), antes e 14 dias após as doses *booster*, administradas 2, 4 e 6 meses após a imunização primária (B). C) Contra a cepa H355 (B:15:P1.19,15:L3,7,9,8) e suas variantes PorA⁻ e Opa⁻; as amostras foram obtidas 14 dias após a terceira dose. As barras representam a mediana dos anticorpos opsonizantes de 5-12 animais por grupo.

10.3 Artigo 2 (estudo em voluntários): Human antibody and memory B and T-cell responses after primary and booster immunisation against *Neisseria meningitidis* B

Os resultados obtidos em modelo animal elucidaram alguns dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de memória imunológica após vacinação contra MenB. Decidimos avaliar a reprodução destes dados em humanos. Para tanto, seis voluntários saudáveis que não tinham sido vacinados previamente contra MenB ou acometidos pela doença, receberam 3 doses da vacina VA-MENGOC-BC® e uma dose reforço, administrada 6 meses após a última dose do esquema primário de imunização.

Neste artigo (Cruz et al., 2011), investigamos a resposta funcional dos anticorpos (bactericida e opsonizante), além do desenvolvimento de plasmócitos, de LBm e de células T de memória/ativada a partir das PBMCs. Os resultados demonstraram que 3 doses da vacina foram necessárias para induzir uma resposta de LBm detectável (média = 0,46%) em todos os indivíduos do estudo. Esta resposta tornou-se indetectável seis meses mais tarde. Após a dose reforço somente 2 dos 5 voluntários responderam com um aumento das frequências de LBm (média = 0,15% e 0,34%).

De forma similar, não detectamos uma resposta humoral típica de memória imunológica após a dose *booster*. Os níveis de anticorpos bactericidas e opsonizantes foram maiores após a imunização primária (média = 4,7 e mediana = 1212, respectivamente), quando comparados com o pós-*booster* (média = 2,6 e mediana = 285, respectivamente). Em conjunto, esses resultados sugerem que existe uma falha da vacina em manter o número e/ou ativação de LBm de vida longa e consequentemente de manter a memória sorológica em adultos. Em contraste, foi observada uma resposta significativa e funcional de LTm especialmente após o *booster*, com o predomínio de linfócitos T_{CM} ativados (CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺CD69⁺).

Desta forma, os estudos em humanos sugerem que a imunização com vacina anti-MenB induziu o desenvolvimento e ativação de LTm, porém falhou em manter a população de LBm funcionalmente estável. A fraca resposta de anticorpos após o *booster* reforça a existência de alguma deficiência da vacina em induzir ou manter os LBm.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Human antibody and memory B and T-cell responses after primary and booster immunisation against *Neisseria meningitidis* B

Simone C. Cruz^a, Simone L. Souza^b, Aline C. Cruz^a, Giselle P. Silva^a, Lucimar G. Milagres^{a,*}

^a Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 3º andar, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Patologia e Laboratórios, CEP: 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2011
Received in revised form 15 July 2011
Accepted 17 July 2011
Available online xxx

Keywords:

Memory CD4⁺ T-cells
Memory B-cell
Vaccine
Neisseria meningitidis

ABSTRACT

Vaccination against disease aims at the induction of long-lasting cellular and humoral immune responses. Few studies have addressed the mechanisms by which meningococcal vaccines generate and sustain immunological memory. The goal of this study was to investigate the development of long-term humoral and cellular memory to *Neisseria meningitidis* serogroup B (MenB) in health subjects after immunisation with the Cuban outer membrane protein (OMP) vaccine (VA-MENGOC-BC®). The results showed that three doses of vaccine were necessary to induce a detectable memory B-cell response (mean of 0.46%) which became undetectable 6 months later. After boosting, only 2 of 5 individuals responded with an increase in memory B-cell frequencies (values of 0.15% and 0.34%). Bactericidal and opsonic antibody levels were higher after primary immunisation (log₂ mean and median of 4.7 and 1212, respectively) when compared with post-booster response (log₂ mean of 2.6 and median of 285, respectively). Together, these data suggest a failure of vaccine to induce long-term memory B-cell and serological memory in adults. However, we observed a significant and functional memory T-cell response specially after boosting, with a predominance of activated (CD69⁺) central memory T-cell (CD4⁺CD45⁺CCR7⁺) response. Therefore, this study suggests that vaccination with the MenB vaccine induced the generation and activation of memory T-cells but failed to maintain the memory B-cell population at a stable size and/or function.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neisseria meningitidis is a human pathogen and one of the major causes of bacterial meningitis [1]. Polysaccharide vaccines available both in protein conjugated and non-conjugated form, have been introduced against capsular serogroups A, C, W-135 and Y, but are ineffective against serogroup B meningococci, which cause a significant burden of disease in many parts of the world. Detoxified outer membrane vesicles have been used for decades to elicit protection against epidemic serogroup B disease [2].

Considerable evidence indicates that complement-mediated serum bactericidal antibody (SBA), induced by nasopharyngeal colonization or vaccination, confers protection against MenB [3,4]. Soluble antibodies maintain a first line of defence to extracellular pathogens both systemically and at mucosal surface and are recognised as serological memory. In contrast, memory-B cells are able

to provide more antibody-producing cells (ASC) after re-exposure to specific antigens or polyclonal stimuli [5,6]. Ideally, vaccination against *N. meningitidis* should provide protection for life by the continuous production of high titers of specific antibodies or the ability to respond rapidly to mount for an anamnestic antibody response [7].

Besides the memory antibody response, the cellular pattern of immune response has an important role in maintenance of immunological memory. Three subsets of T-cells have been identified based on expression patterns of CD45RA and the chemokine receptor CCR7 [8]. Two subsets represent in fact different stages of maturation with CD45RA⁺CCR7⁺ central memory T-cells (T_{CM}) being the least differentiated, CD45RA⁺CCR7⁺ effector memory T-cells (T_{EM}) representing an intermediate stage, and CD45RA⁺CCR7⁺ effector terminally differentiated T-cells (T_{ET}) being the most differentiated ones [9].

Determination of the expression of surface antigens is an alternative method for evaluating the lymphocyte effector function [10]. The CD69 antigen has been identified as the earliest activation marker on the surfaces of antigen- or allergen-specific activated lymphocytes in vitro [11]. Once CD69 is expressed, it acts as a co-stimulatory molecule for T-cell activation and proliferation [12].

* Corresponding author at: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Dpto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, 3º andar, Vila Isabel, CEP: 20.551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: +55 021 2868 8280; fax: +55 021 2868 8376.

E-mail addresses: lucimar@uerj.br, milagreslucimar@gmail.com (L.G. Milagres).

Understanding the mechanism by which meningococcal vaccines generate and sustain the serological and cellular immune memory is essential to improving the long-term efficacy of MenB vaccines. We have previously shown that MenB vaccine induced a strong ASC primary response in mice, but the recall response showed a limited power over time. Nonetheless, memory B-cells were maintained over the time and were probably responsible for the strong antibody response seen after booster vaccination [13].

In the present study, we investigated the development of long-term humoral and cellular (ASC, memory B-cells, memory/effector T-cells) responses after immunisation of health subjects with the VA-MENGOC-BC[®] vaccine. Functional antibody analyses were investigated by bactericidal and opsonic assays using the homologous strain and strains lacking PorA or Opa proteins as the target strains.

2. Subjects and methods

2.1. Study participants

Six healthy volunteers (5 women and 1 man) aged 23–45 were enrolled in this study. Vaccination and venipuncture was done with the consent of the donors after the nature and possible consequences of the study had been fully explained. Ethical approval was obtained from the HUPE Research Ethics Committee (Protocol number CEP/HUPE: 2743/2010). Exclusion criteria included previous vaccination with VA-MENGOC-BC[®], use of antibiotics, documented immunodeficiency, chronic debilitating illness or any past episode of meningitis.

2.2. Vaccination and specimen collection

Following informed consent, the cohort received three doses of VA-MENGOC-BC[®], applied with a 6–8-week interval and a booster dose applied 6–7 months after the primary immunisation. Vaccine was administered by intramuscular injection into the non-dominant deltoid muscle. Blood was taken before and 3, 7 and 14 days after each injection of vaccine during the primary immunisation schedule and 6–7 months (pre-booster sample) after the third dose. After the booster dose, blood was collected at days 3, 7, 14 and 28. A maximum volume of 10 ml heparinised blood was available for the separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMCs were separated by density-gradient centrifugation over Histopaque[®] (Sigma, St. Louis, USA). Plasma was collected and frozen at –20 °C.

2.3. Serogroup B meningococcal strains

The Cuban vaccine strain (Cu385/83) of serotype:serosubtype:immunotype 4,7:P1.19,15:L3,7,9 was used for the preparation of outer membrane vesicles (OMV) to be used as the coat antigen for ELISPOT and as a target strain for the bactericidal assay. H355/75 (B:15:P1.19,15:L3,7,9,8) and its variants PorA[–] and Opa[–] were also used for the opsonic and bactericidal antibody assays. The origin of these strains was previously described [14].

2.4. Detection of plasma cells

PBMCs prepared from peripheral blood were washed in RPMI 1640 (HyClone, Utah, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 5×10^{-5} β -mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, USA) and antibiotics (10,000 U/ml penicillin (Sigma) and 10 mg/ml streptomycin (Proquímios, Rio de Janeiro, Brazil)) and re-suspended to a final concentration of 1×10^5 PBMC/well. Cells were then quantified by ELISPOT technique as previously described

[15]. Briefly, 96-well Maxisorp plates (Nunc, Rochester, USA) were coated either with 10 μ g/ml of anti-human IgG monoclonal antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, USA), or 4 μ g/ml of OMV (Cu385 strain) in 0.05 M Tris buffer, pH 9.5, overnight at 4 °C. After washing with phosphate buffer saline (PBS) 0.01 M, pH 7.2–7.4, plates were blocked for 1 h with RPMI supplemented with 1% fetal bovine serum and antibiotics (150 μ l/well). Then 100 μ l/well of the cells suspension was added to pre-coated ELISPOT plates, and incubated for 16 h at 37 °C in 5% CO₂ and then washed with PBS/1% Tween 20 (T20). Secreted IgG was detected with anti-human IgG alkaline phosphatase-conjugated mAb (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland, USA) at a dilution of 1:5000 in PBS/1% BSA/0.1% T20. ELISPOTs were developed with 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP; Sigma) dissolved in amino-methyl-propanol buffer (Sigma). Spots were counted after 2 h by stereoscopic microscopy.

Mean values of spots were calculated from six replicates. OMV specific ASC levels were expressed as a percent of total IgG-secreting B-cells or as a frequency per 2×10^5 PBMC.

2.5. Detection of memory B-cells

PBMCs prepared from peripheral blood were re-suspended in complete RPMI medium with 10% fetal bovine serum at a final concentration of 1×10^7 PBMC/ml. Five to six replicates of 100 μ l of cells were added to 96-well flat-bottomed culture plates followed by 100 μ l of complete RPMI containing 1/5000 *Staphylococcus aureus* cells (Cowan 1) (Calbiochem, USA) and 100 IU/ml interleukin-2 (Calbiochem, USA) [15]. The cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 6 days before being re-suspended and washed three times in complete medium with 1% fetal bovine serum. The cultured cells were plated onto pre-coated ELISPOT plates at 2×10^5 cells/well and then incubated and developed as described for plasma cells.

2.6. FACS analysis

Freshly prepared PBMC (1×10^6 cells/100 μ l) were plated in 96-well flat-bottom plate in complete RPMI medium, stimulated with OMV of Cu385 strain at 50 μ g/ml or PHA (Sigma) at 10 μ g/ml or un-stimulated during incubation for 3 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Mononuclear cells were pre-incubated with human serum (1 μ l/well) for 15 min at 4 °C before staining the cells for surface markers. Cells were stained for a panel of cell surface markers including fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD4; phycoerythrin (PE)-conjugated CCR7; PerCP-conjugated CD69; and APC-conjugated CD45RA (all from BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Samples were analyzed on a Becton Dickinson FAC-Scalibur flow cytometer. On acquisition, a gate was set around the lymphocyte population on a forward scatter versus side scatter plot, and 10,000-gated events were collected for each sample. Data analysis was performed using FlowJo software, version 7.6.4. CD4⁺ T-cells were gated from the lymphocyte population and then analyzed for the expression of CD45RA, CCR7 and CD69. Appropriate isotype matched controls (BD) were run in parallel for each sample.

2.7. Bactericidal assay

Serum bactericidal antibodies were measured as previously described [14]. Briefly, the final reaction mixture contained 25 μ l of diluted test serum previously heat inactivated at 56 °C for 30 min, 12.5 μ l of human serum that lacked detectable intrinsic bactericidal activity diluted at 1:2, and 12.5 μ l of log phase meningococci (about 5×10^3 CFU/ml) grown on Tryptic Soy Broth (Acumedia Manufactures, Maryland, USA) solidified with 2% (w/v) Noble agar (Merk) and containing 1% (v/v) horse serum. The bactericidal reaction was

carried out at 37 °C for 30 min. The CFU per well were determined with the aid of a stereoscopic microscope ($\times 40$). The bactericidal titer was defined as the reciprocal of the serum dilution (before addition of complement and bacteria) causing $\geq 50\%$ killing and recorded as the $\log_2$ titer. A value of 1 was assigned to each titer of <2 ; thus, $\log_2 1 = 0$. The positive control for each assay consisted of a pool of post-vaccination mouse serum with previously determined bactericidal titer. The negative control consisted of the complement source in the absence of test serum.

2.8. Opsonic assay

2.8.1. Protein-coating of latex beads

The protein-coating of latex beads was performed as previously described [16]. Briefly, OMVs from serogroup B meningococci were adsorbed to fluorescent polystyrene latex microspheres (Fluoresbrite Plain Microspheres, Polysciences, Warrington, Pennsylvania) of approximately size of meningococci (1 μm of diameter). FITC was incorporated within the polymer, leaving the surface free to adsorb the protein. The latex beads (500 μl , 4.55×10^{10} beads/ml) were centrifuged at $15,600 \times g$ for 5 min, and the pellet was suspended in a 940 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution of OMV in 0.1 M borate buffer (0.1 M boric acid, adjusted to pH 8.5) followed by end-to-end rotation overnight (20 h) at 20 °C. After additional blocking of unreacted sites on the OMV beads with 2% bovine serum albumin (BSA) in 0.1 M borate buffer, the OMV-bead pellet was suspended in storage buffer (0.1 M phosphate buffer, containing 5% glycerol, 0.02% merthiolate and 1% BSA, pH 7.4), and kept protected from daylight in aliquots at 4 °C until used.

2.8.2. Opsonisation and phagocytosis

The antigen coated bead suspensions (100 μl , 3.3×10^8 beads/ml) were opsonised for 8 min with 25 μl of diluted test serum (1:20) previously heat inactivated at 56 °C for 30 min, with a total sample volume of 400 μl obtained by addition of PBS-BSA, supplemented with CaCl_2 (0.98 mM) and MgCl_2 (1 mM). 25 μl of human serum that lacked detectable intrinsic opsonisation activity diluted at 1% was added to the reaction and were incubated with end-to-end rotation for 8 min at 37 °C. Donor leukocytes (100 μl , $1.25 \times 10^7/\text{ml}$) were added and the suspensions were incubated for 8 min. Phagocytosis was terminated by adding 1.5 ml of ice-cold PBS supplemented with 0.02% EDTA. The suspensions were kept on ice until analyzed by a FACScalibur flow cytometer [16].

2.9. Statistical analysis

The levels of significance of the differences between groups were examined by Paired or Unpaired t test (parametric tests) For nonparametric data we used Mann-Whitney test (unpaired samples) or Wilcoxon matched pair test (paired samples). These analyses were performed with a GraphPad-Prism software, version 4.02. $P < 0.05$ was taken as significant.

3. Results

3.1. Specific memory B-cell response to MenB

Fig. 1A shows the percent of specific memory B-cells detected as specific ASC after in vitro stimulation of peripheral blood memory B-cells for 6 days. Memory B-cells were detected only in one individual 7 days after the first dose (0.5%) and in 2 individuals at 14 days (mean of 0.16%). A significant memory B-cell response was seen 7 days (mean of 0.27%) and 14 days (mean of 0.46%) after the third vaccination. At this time, memory B-cells were detected in

all individuals, with frequencies varying from 0.14 to 0.95%. A significant decrease of memory B-cells was recorded 6 months (mean of 0.03%) later (pre-booster). Surprisingly, 14 days after the booster dose, only 2 of 5 individuals responded with an increase in memory B-cell frequencies with values of 0.15% and 0.34% (mean of 0.1% for all individuals).

As can be seen in Fig. 1B, we observed a continuous and gradual decrease ($P > 0.05$) for specific ASC in blood of vaccinees 7–8 days after each vaccine injection. No significant correlations were detected between memory B-cells and ASC at any time point analyzed.

These data indicate that three doses of vaccine were necessary to induce a sufficiently robust memory B-cell response which was of short duration since there was a weak activation of these cells 6 months later when the booster dose was administered. The reasons for the gradual decline of specific ASC in blood are unknown.

3.2. Bactericidal antibody response

Fig. 2A shows a gradual increase of antibody titers (expressed as $\log_2$ values) after the first immunisation measured at 3, 7 and 14 days. The peak of antibody titers was detected at 14 days with a median of 2.7 (mean of 3.6, Fig. 2B). Bactericidal titers dropped significantly 28 days later (42 days after the first dose). The antibody response was faster after the second dose of vaccine and reached its maximal at 14 days with a median of 4 (mean of 3.8, Fig. 2B). Despite the decrease of antibody titers observed 35 days later (49 days after the second dose) 5 of 6 subjects still had bactericidal antibody levels above the threshold of protection (titer of 1:4 or $\log_2$ of 2). A small increase in antibody levels was seen 14 days after the third dose of vaccine (median and mean of 4 and 4.7, respectively) (Fig. 2A and B) with a significant decrease 6 months later (median and mean of 0.5 and 1.5, respectively). The booster dose administered at this time induced an increase ($P = 0.003$) in bactericidal antibody response (median and mean of 2 and 2.6, respectively) but the boosting response was significantly lower than the bactericidal antibody response induced by 2 or 3 doses of vaccine. Nonetheless, 4 of 5 individuals still had protective antibody titers (Fig. 2B).

Two of 6 individuals showed the presence of protective bactericidal titer before vaccination (Fig. 2B). Both individuals had at least a 4-fold increase in antibody titers after 2 or 3 immunisations.

Thus, one dose of vaccine induced a high bactericidal antibody response 14 days later. This response slightly increased after 2 and 3 injections of vaccine but was of short duration and was not strongly activated by the booster vaccination.

To investigate the role of PorA and Opa proteins on bactericidal antibody titers, we used H355 strain (PorA homologous to the vaccine strain) and its variants (PorA[−] and Opa[−] strains) as the target strains for the bactericidal assay. As shown in Fig. 2C, serum samples collected before immunisation had variable antibody titers against H355 strain, with a mean of 1.7. Three individuals had bactericidal antibody titers to H355 strain above the protective threshold titer ($\log_2 \geq 2$). Pre-vaccine antibodies recognised PorA and Opa proteins since a significant decrease in antibody titers occurred when PorA[−] and Opa[−] mutant strains were used as the target strain (Fig. 2C). Concerning the post-primary immunisation antibody response to the mutant strains (Fig. 2D), one can clearly see a significant drop in bactericidal antibody titers when the PorA[−] but not the Opa[−] strain was used as the target strain. These results indicate a prominent role for PorA, contained in the MenB vaccine, of inducing bactericidal antibodies.

3.3. Opsonic antibody response

Fig. 3A shows the opsonic antibody response to the vaccine strain measured as median of fluorescence induced during the burst

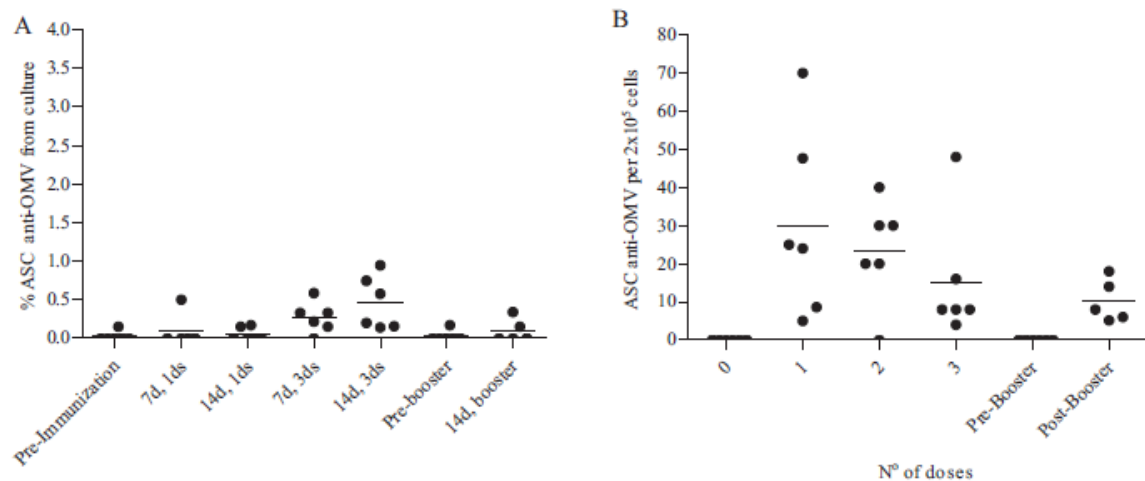


Fig. 1. Mean values of (A) specific ASC from 6 days culture (memory B-cell) against OMV of MenB:4,7:P1,19,15 (strain Cu385/83) as percent of total IgG-ASC detected in peripheral blood of volunteers; (B) ASC in blood as number of specific ASC per 2×10^5 PBMC in well. The lines represent the average response of 6 or 5 individuals for each time point.

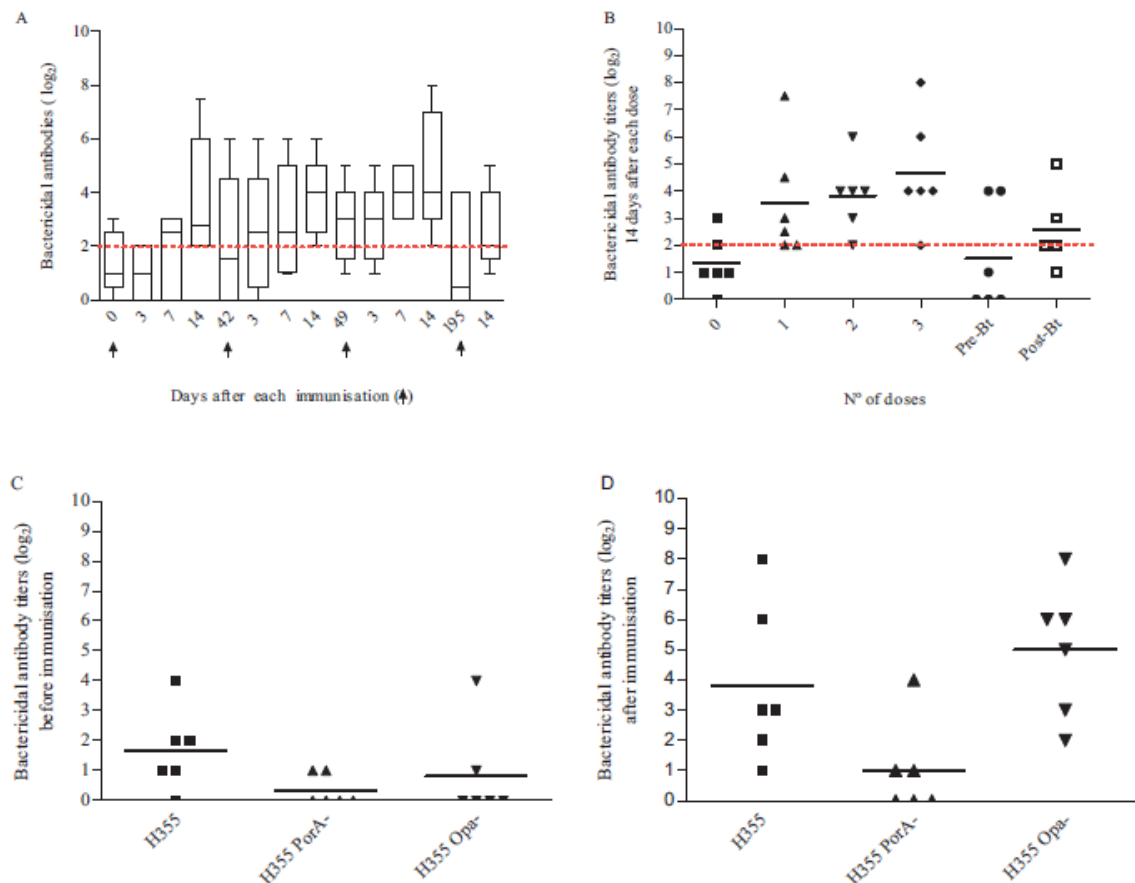


Fig. 2. Bactericidal antibody response of vaccinated (VAMENGOC-BC[®] vaccine) volunteers to (A) MenB:4,7:P1,19,15 (Cu385/83 strain). The data show the minimum and maximal values, the median, and 25 and 75% percentiles of serum bactericidal titers detected several days after each immunisation (total of four); (B) Cu385/83 strain as log₂ mean of antibody titers determined 14 days after each dose; (C) H355/75 (B:15:P1,19,15) strain and its mutants lacking PorA or Opa in serum sample collected before immunisation and (D) 14 days after the third dose of vaccine. Serum samples of 6–5 (post-booster) individuals were analyzed at each time point. Dashed line in A and B represents the protective bactericidal titer (1:4 or log₂ of 2). The lines represent the average of bactericidal antibody titers.

oxidative of neutrophils. A significant increase in opsonic antibody levels was recorded after 1 or 3 doses (median of 697 and 1395, respectively) of vaccine. A subsequent decline ($P < 0.05$) of antibody concentrations (median and mean of 20) was registered 6

months after the third dose (pre-booster) with a little increase of antibody levels after the booster dose (median and mean of 20 and 285, respectively). As one can see in Fig. 3B these antibodies were predominantly directed to PorA protein.

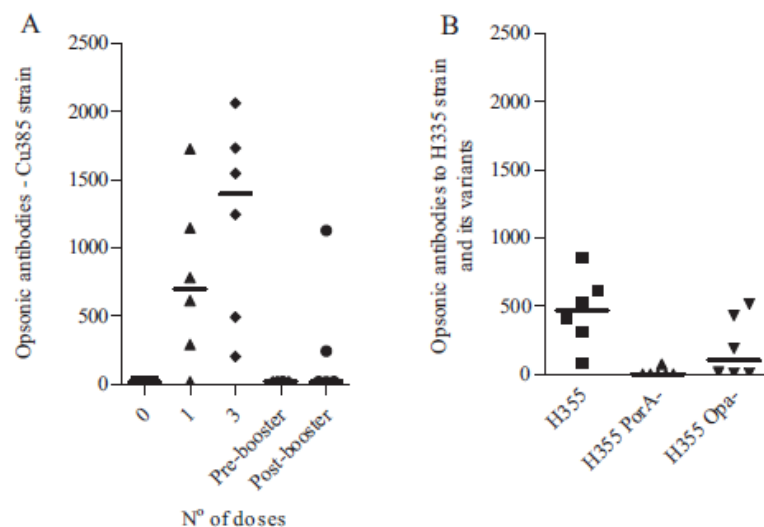


Fig. 3. Opsonic antibody response measured as median of fluorescence induced during the burst oxidative of neutrophils to (A) the vaccine strain (Cu385/83); serum samples were obtained 14 days after each immunisation and (B) H355/75 (B:15:P1.19,15) strain and its variants PorA⁻ and Opa⁻; serum samples were obtained 14 days after third immunisation. The line represents the median response of 6 or 5 (post-booster) individuals for each time point.

Overall, significant correlations were not found between circulating bactericidal or opsonic antibody titers and frequencies of memory B-cells, except for positive correlation between opsonic antibodies and memory B-cells after the booster dose ($r = 0.99$, $P = 0.0002$). Despite the same kinetics of response, there was no correlation between opsonic and bactericidal antibody titers at any time point of the study. These observations are in accordance with published data [15] and suggest the importance of measuring not only serum antibodies as a sole marker for vaccine efficacy.

3.4. Memory T-cell response

To distinguish the putative virgin and memory CD4⁺ T-cell subsets, we analyzed the expression of CD45RA and CCR7. The virgin subset is CD45RA⁺CCR7⁺, whereas the memory/effector subsets are CD45RA⁺CCR7⁻ (T_{CM}) or CD45RA⁻CCR7⁻ (T_{EM}). Because effector terminally differentiated T-cells (T_{ET}) can re-express CD45RA, we also included the T cells CD45RA⁺CCR7⁻ as T_{EM} . To calculate the relative frequency of T_{EM} and T_{CM} we considered the sum of the percentage of the three quadrants representative of the memory/effector cells as 100%.

Fig. 4A and B shows the mean percentage of T_{CM} and T_{EM} cells, relative to total memory/activated cells, before and 3 days after primary immunisation of volunteers with the MenB vaccine. In general, the frequencies of T_{EM} were higher ($P > 0.05$) than T_{CM} frequencies. Interestingly, T_{CM} proportions increased (+7%, $P > 0.05$) after OMV stimulation of cells (mean of 42% versus 35% before stimulation). In contrast, the presence of antigen induced a decrease (-6%, $P > 0.05$) in T_{EM} frequencies from a mean of 64–58%, probably reflecting their terminal differentiation after stimulation. These data indicated the specificity of the reaction, since we worked with the whole population of CD4⁺ T-cells. About 6 months after the primary immunisation (day 0 after booster) the percentage of MenB-specific T_{CM} (mean of 49%) and T_{EM} (mean of 51%) were similar (Fig. 4C and D). The booster dose induced a gradual increase, from 3 days to 14 days, in MenB- T_{CM} reaching statistical significance 14 days later (mean of 65%). In contrast, a gradual decrease was seen for MenB- T_{EM} frequencies at the same period. At 14 days post-boosting, MenB- T_{CM} frequencies (mean of 65%) were higher ($P < 0.05$) than MenB- T_{EM} frequencies (mean of 35%). By 28 days after boosting MenB- T_{CM} frequency (mean of 59%) decreased to

levels not significantly different from the ones detected before booster (mean of 57% from days 0 to 14) but remained higher ($P < 0.05$) than MenB- T_{EM} frequency (mean of 41%). Similar changes were observed for MenB- T_{EM} frequencies at day 28 (mean of 41%) which returned to levels statistically similar to pre-boosting (mean of 51%) (Fig. 4B).

Therefore, these data indicated that in contrast to the early primary T-cell response, the 14 day-recall response to vaccination was marked by a predominance of T_{CM} . This difference may be attributed to the fact that the analysis of T-cell frequency after the primary series was restricted to a period of 3 days. By day 28, post-boosting T memory-cells returned to homeostatic levels.

In agreement with the significant increase of MenB- T_{CM} frequency at 14 days after booster immunisation, these cells reached a maximal ($P < 0.05$) frequency of activation by day 14 after booster (mean of 26%) as determined by the expression of CD69 (Fig. 5C). From days 3 to 14 after boosting frequencies of activated MenB- T_{CM} (13–26%) were significantly higher than activated MenB- T_{EM} frequencies (5.8–9.2%) (Fig. 5C and D). MenB- T_{EM} reached its maximal expression of CD69 at day 28 (mean of 14.6%, $P < 0.05$ compared to day 14 but not to day 0) after boosting but were still lower in frequency than the T_{CM} /CD69⁺ (mean of 22.8%) at the same time point.

No significant differences were seen in activation status of specific T_{CM} and T_{EM} after primary immunisation (Fig. 5A and B), although a discrete increase of T_{CM} /CD69⁺ was detected after the third dose (mean of 4.1%) of vaccine when compared with 1 dose (mean of 2.3%) or before vaccination (mean of 1.3%) (Fig. 5A). Fig. 5B shows that about 1.7% of T_{EM} cells were activated before or after immunisation.

In conclusion, vaccination with the Cuban MenB vaccine induced a significant memory CD4⁺ T-cell population that was activated by the booster immunisation. As expected for an efficient recall response, T_{CM} was readily activated after stimulation with specific antigen.

4. Discussion

The design of optimal strategies to improve MenB vaccine efficiency is an ongoing challenge [4,17]. We reported here that the porin PorA, the serosubtype protein of meningococci, had a promi-

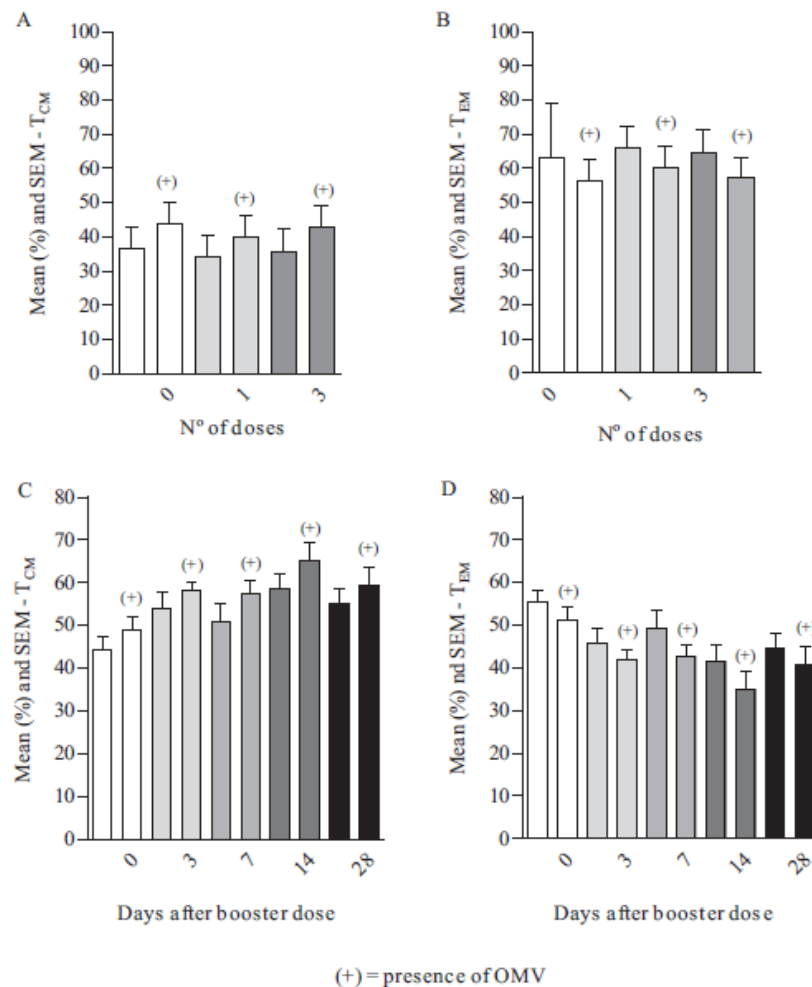


Fig. 4. Mean frequencies (%) and standard error (SEM) of memory CD4⁺ T-cells in PBMC obtained before and 3 days after primary immunisation (A and B) or before (0) and 3, 7, 14 and 28 days after the booster dose administered at 6–7 months following the third dose of VA-MENGOC-BC[®] vaccine (C and D). PBMC cells were stimulated (+) or not with OMV from strain Cu385/83 (MenB:4.7:P1.15,19). (A) Central memory CD4⁺ T-cells (T_{CM}; CD45RA⁺CCR7⁺) and (B) effector memory CD4⁺ T-cells (T_{EM}; CD45RA⁺CCR7⁺). C and D represent T_{CM} and T_{EM} frequencies detected several days after the booster dose. To calculate the relative frequency of T_{EM} and T_{CM} we considered the sum of the percentage of the three quadrants representative of the memory/effector cells as 100%.

nent role in inducing bactericidal as well as opsonic antibodies after immunisation of volunteers with the VA-MENGOC-BC[®] vaccine. Similarly, previous studies have demonstrated the potential of PorA, especially loops 1 and 4, for evoke bactericidal antibodies [18,19]. In contrast, opsonic antibodies have been shown to be directed mainly to PorB proteins [20,21].

Maintenance of long-term memory responses is critical for protective immunity against *N. meningitidis*. However, the duration of humoral immunity and the role played by memory B-cells remain poorly defined. Memory B-cell developmental program requires antigen-specific CD4⁺ T-cell help [22]. A reported study showed that children of all ages can produce in vitro cellular immune responses following meningococcal infection [23]. To better understand the potential of the Cuban vaccine to induce immunological memory we performed a longitudinal analysis of memory B-cell frequency, the kinetics of functional antibody response as well as the memory T-cell frequencies and activation status after immunisation of adult volunteers with the Cuban MenB vaccine (VA-MENGOC-BC[®]).

Despite the small number of individuals in this study, our results indicated a short duration of the humoral immunity in terms of both frequency of memory B-cells and functional antibody titers. The

frequencies of memory B-cells varied from 0.14% to 0.95% (median of 0.46%) 14 days after the third vaccination. This is in agreement with results of Sasaki et al. [24], who found a rather constant frequency of approximately 0.5% influenza-specific memory B-cells in circulating blood from 27 to 42 days after vaccination. However, for 5 out of 6 individuals, the MenB specific memory B-cells declined to undetectable values 6 months after the primary series. The booster dose induced a recall response only in 2 of 5 individuals. These data are in contrast with the results of Nanani et al. [15] who showed that specific memory B-cells accumulate with every immunisation dose of tetanus or diphtheria vaccine and remain elevated over several years. Similar to the memory B-cell response, post-boosting bactericidal antibody levels were significantly lower than after 3 doses of vaccine, with 3 of 5 individuals presenting a 4-fold increase in antibody titers. A similar antibody response pattern was observed for opsonic antibodies.

Due to the continuous re-circulation of memory B-cells through the blood and secondary lymphoid organs it is assumed that memory B-cells found in the circulation should be representative for the entire B-cell pool [15,25]. A recent report of long-term presence of memory B-cells specific for tetanus, pertussis, measles and influenza virus found that the frequencies of these cells varied

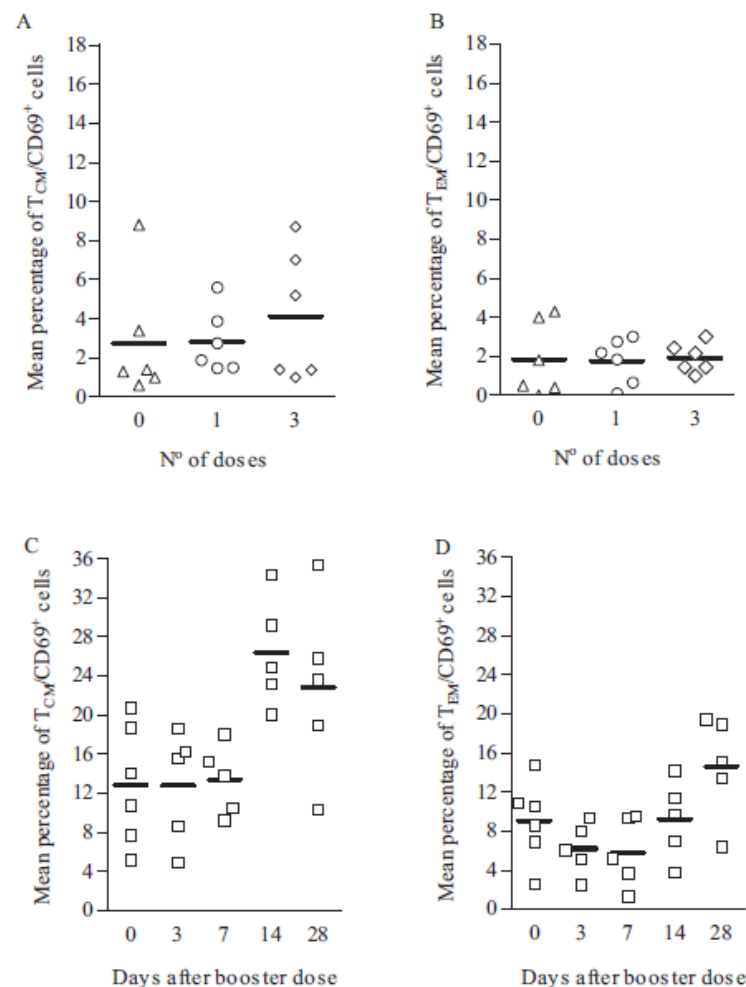


Fig. 5. Mean percentage of memory T ($CD4^+$) cells expressing the CD69 molecule, a marker for recent cell activation, after primary immunisation (A and B) and after the booster dose administered at 6–7 months after the third dose of VA-MENGOC-BC[®] vaccine (C and D). Cells were stimulated for 3 h or not with OMV and % of CD69⁺ cells values were calculated after subtraction of % of CD69⁺ cells in un-stimulated controls. (A) Frequency of central memory T cells (T_{CM} ; $CD45RA^-CCR7^+$) CD69⁺ cells, 3 days after each dose and (B) frequency of effector memory T cells (T_{EM} ; $CD45RA^+CCR7^-$) CD69⁺ cells, 3 days after each dose. C and D represent T_{CM} and T_{EM} frequencies detected before (0) and 3, 7, 14 and 28 days after the booster dose.

between 0.02% and 0.87% of the total IgG producing cells. Of note, memory B-cells were detected in all individuals for all antigens tested [25], indicating a high sensitivity of the assay, which used CpG, IL-2, IL-10 and IL-15 as polyclonal stimulators of B-cells. The assay used in our study may be of lower sensitivity compared with the latter, since we used only IL-2 and SAC as polyclonal stimulators of B-cells. Nonetheless, our results showed that the profile of memory B-cell response of vaccinated volunteers was kinetically accompanied by serum bactericidal and opsonic antibody responses indicating the presence of short lived memory B-cells or poor activation of these cells. Further cellular studies are needed to understand how MenB OMV antigens could mediate the induction of effective primary B-cell response with limited memory capacity.

A study described by Luijckx et al. [26] showed that mouse B-cell subpopulations involved in a successfully bactericidal and affinity matured antibody response to PorA P1.5-1.2-2 are maintained at smaller population sizes than those associated with poor antibody response to PorA P1.7-2.4. Our human and mouse antibody studies have shown a strong immunogenicity of PorA P1.19,15 protein [14,18,27]. This protein has also induced a robust specific ASC response in mouse spleen and bone marrow after primary immunisation, but not after boosting [13]. Moreover, a constant level

of about 1% of specific spleen memory B-cells was detected after primary and booster immunisation [13]. Thus, our human and animal studies with the VA-MENGOC-BC[®] vaccine showed a lower or an unaltered B-cell response (ASC and/or memory B-cell) after boosting, suggesting some limitations in the long-term effect of vaccination.

Specific $CD4^+$ T-cells found in naive, T_{CM} , or T_{EM} populations largely differ in their functional properties, such as antigen requirement for maximal efficiency, effector activity (level of cytokine secretion, co-stimulatory molecule expression), replicative activity, and/or life span [8,9]. Specific T-cell expansion of either population may therefore influence the protective efficacy of the pathogen-targeted, specific immune response. Three days after the primary immunisation schedule we observed a slightly predominant T_{EM} ($CD45RA^+CCR7^-$) response (mean of 58% when stimulated by OMV), with a discrete proportion (mean of 1.7%) of activated cells (CD69⁺). Cell activation was slightly higher (mean of 4.1%) for T_{CM} ($CD45RA^-CCR7^+$) which was presented in a mean proportion of 42%. However, after boosting, a predominant expansion of the T_{CM} population was observed (mean of 57%) paralleled by a continuous decrease of T_{EM} (mean of 42%) up to 14 days. As indicated by the expression of CD69, activated cells were mainly

present within the T_{CM} population. Similar results were recently reported after recall immunisation with tetanus toxoid [28]. Thus, these data showed that the T-cell response to vaccination had a different kinetics of the B-cell response, which was higher after primary immunisation and declined after boosting. The question arises how T-B-cell interactions differ after primary and booster vaccination with the OMV vaccine. The neisserial porins are the major protein components of OMV present in the Cuban MenB vaccine. They have been shown to be able to enhance the immune response to poorly immunogenic substances (e.g., polysaccharides) and up regulation of B7-2 on the surface of B lymphocytes may be the mechanism behind this immune-potentiating activity [29]. However, B-cells also have a role to act as a counter regulatory in balancing pathogen-specific immune responses. B-cells activated by *Helicobacter* TLR-2 ligands induce IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T regulatory-1 (Tr-1)-like cells in vitro and in vivo [30]. Tr-1 conversion depends on TCR signaling and a direct T/B-interaction through CD40/CD40L and B7-1/CD28. B cell-induced Tr-1 cells acquire suppressive activity in vitro and in vivo. In addition, systemic injection of Pam2 lipopeptides (a TLR-2 ligand) induced IL-10 in a TLR2-dependent manner [31]. The Pam2 lipopeptides increased the frequencies of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T (T reg) cells in a TLR2- and IL-10-dependent manner. Then, the possibility that human OMV vaccination induced T regulatory cells which suppressed B cell activation cannot be ruled out and further investigation may be conducted in the future. Interesting enough, we have previously reported a negative dose-effect on booster bactericidal antibody response, in that mice immunised with four doses of VA-MENGOC-BC[®], but not with two or three doses, responded less well to the booster dose compared with the primary series [14].

In conclusion, this study suggests that vaccination with the VA-MENGOC-BC[®] induced a robust immune response after three injections of vaccine. Vaccination induced the generation and activation of memory T-cells after primary and booster schedules but failed to maintain a memory B-cell population at a stable size and/or functionality. The weak boosting antibody response reinforces suboptimal recall functions of the remaining memory B-cell population. More studies are needed in view of the scarce knowledge about cellular mechanisms of antibody response and development of immunological memory by meningococcal vaccines.

Acknowledgements

We are thankful to Ricardo da Costa Cruz for proof-reading the manuscript. We acknowledge FAPERJ/SR2-UERJ/CAPES and CNPq for financial support. This study would not be possible without the consent of the volunteers.

References

- [1] Harrison LH, Pelton SI, Wilder-Smith A, Holst J, Safadi MA, Vazquez JA, et al. The global meningococcal initiative: recommendations for reducing the global burden of meningococcal disease. *Vaccine* 2011;29:3363–71.
- [2] Vogel U, Claus H. Vaccine development against *Neisseria meningitidis*. *Microb Biotechnol* 2011;4:20–31.
- [3] Borrow R, Carlone GM, Rosenstein N, Blake M, Feavers I, Martin D, et al. *Neisseria meningitidis* group B correlates of protection and assay standardization—international meeting report Emory University, Atlanta, Georgia, United States, 16–17 March 2005. *Vaccine* 2006;24:5093–107.
- [4] van Alphen L, van den Dobbelaars G. Meningococcal B vaccine development and evaluation of efficacy. *Hum Vaccine* 2008;4:158–61.
- [5] Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009;39:2065–75.
- [6] Manz RA, Thiel A, Radbruch A. A lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997;388:133–4.
- [7] Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 2003;171:4969–73.
- [8] Sallusto F, Lening D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708–12.
- [9] Harari A, Vallerie F, Pantaleo G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur J Immunol* 2004;34:3525–33.
- [10] Hara T, Jung J, Bjorn Dahl JM, Fu SM. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med* 1988;164:1988–2005.
- [11] Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994;15:479–83.
- [12] Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem Cells* 1994;12:456–65.
- [13] Cruz SC, Silva GP, Sampaio FJ, Souza SL, Dias AASO, Milagres LG. Comparison of long-term humoral memory development after immunisation against *Neisseria meningitidis* B or diphtheria toxoid. *Vaccine* 2010;28:6841–6.
- [14] Gioia CAC, Sousa AB, Cruz SC, Junior FCS, Andrade AFB, Sassi RM, et al. Effect of a booster dose of serogroup B meningococcal vaccine on antibody response to *Neisseria meningitidis* in mice vaccinated with different immunisation schedules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;40:35–42.
- [15] Nanan R, Heinrich D, Frosch M, Kreth HW. Acute and long-term effects of booster immunisation on frequencies of antigen-specific memory-B lymphocytes. *Vaccine* 2002;20:498–504.
- [16] Lehmann AK, Halstensen A, Holst J, Bassoe CF. Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediators of human opsonophagocytosis. *J Immunol Methods* 1997;200:55–68.
- [17] Findlow J, Borrow R, Snape MD, Dawson T, Holland A, John TM, et al. Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy. *Clin Infect Dis* 2010;51(10):1127–37.
- [18] Milagres LG, Gorla MCA, 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* 1998;66:4755–61.
- [19] Rouppe van der Voort EM, Kuipers B, Brugghe HF, van Unen LM, Timmermans HA, Hoogerhout P, et al. Epitope specificity of murine and human bactericidal antibodies against PorA P1.7.16 induced with experimental meningococcal group B vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;17:139–48.
- [20] Delvig AA, Michaelsen TE, Aase A, Hoiby EA, Rosenqvist E. Vaccine-induced IgG antibodies to the linear epitope on the PorB outer membrane protein promote opsonophagocytosis of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:27–35.
- [21] Lehmann AK, Halstensen A, Aaberge IS, Holst J, Michaelsen TE, Sornes S, et al. Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PorA and PorB. *Infect Immun* 1999;67:2552–60.
- [22] McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:487–513.
- [23] Pollard AJ, Galassini R, van der Voort EM, Hibberd M, Booy R, Langford P, et al. Cellular immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. *Infect Immun* 1999;67:2452–63.
- [24] Sasaki S, Jaimes MC, Holmes TH, Dekker CL, Mahmood K, Kemble GW, et al. Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. *J Virol* 2007;81:215–28.
- [25] Buisman AM, de Rond CG, Oztürk K, Ten Hulscher HJ, van Binnendijk RS. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine* 2009;28:179–86.
- [26] Luijckx TA, van Gaans-van den Brink JA, van Dijken HH, van den Dobbelaars GP, van Els CA. Hyperproliferation of B cells specific for a weakly immunogenic PorA in a meningococcal vaccine model. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1598–605.
- [27] Cruz SC, Cruz AC, Oliveira JM, Soares AM, Gioia CA, Milagres LG. Generation of long-lived plasma cells to serogroup B *Neisseria meningitidis* after murine immunisation with an outer membrane protein vaccine. *Vaccine* 2007;25(27):5046–52.
- [28] Barbey C, Pradervand E, Barbier N, Spertini F. Ex vivo monitoring of antigen-specific CD4⁺ T cells after recall immunization with tetanus toxoid. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:1108–16.
- [29] Wetzler LM, Ho Y, Reiser H. Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* 1996;183:1151–9.
- [30] Savi A, Kohler E, Toller IM, Flavell RA, Müller W, Roers A, et al. TLR-2-activated B cells suppress *Helicobacter*-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *J Immunol* 2011;186:878–90.
- [31] Yamazaki S, Okada K, Maruyama A, Matsumoto M, Yagita H, Seta T. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3/CD25/CD4 regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity by Pam2 lipopeptides in vivo. *PLoS ONE* 2011;6:e18833.

10.4 Resultados complementares em voluntários (não publicados)

Além dos resultados publicados no Artigo 2 (Cruz et al., 2011), investigamos o desenvolvimento de memória imunológica após imunizar 5 voluntários com a dose *booster* da vacina dT. Os indivíduos selecionados não haviam sido vacinados contra a difteria, pelo menos nos 5 anos antecedentes.

10.4.1 Avaliação da frequência de linfócitos B de memória em PBMC de voluntários vacinados com dT

A Figura 3 apresenta a média do percentual de ASC anti-TD recuperadas após 6 dias de cultura (LBm). PBMCs foram obtidas antes e 14 dias após a administração da dose *booster* da vacina dT.

Com base na cinética do desenvolvimento de LBm anti-TD, a dose *booster* da vacina dT induziu um aumento importante, mas não significativo ($P = 0,08$) na frequência dessas células (média = 0,54%) quando comparada com o pré-*booster* (média = 0,1%). A resposta de LBm induzida pela vacina diftérica após a dose reforço foi 5 vezes maior que a induzida pela vacina cubana (média = 0,1%; Artigo 2), sugerindo ser uma vacina mais eficaz no que diz respeito ao desenvolvimento e reativação da memória imunológica humoral.

Figura 3 – Frequência de ASC anti-TD proveniente de 6 dias de cultura (LBm). PBMCs foram obtidas antes e 9-14 dias após a dose *booster* da vacina dT. As barras representam a média de 7-8 indivíduos por grupo.

10.4.2 Linfócitos T de memória

A Figura 4 apresenta a média do percentual de linfócitos T_{CM} e T_{EM} , relacionado ao total de células de memória/ativadas, antes e diferentes dias após a dose *booster* da vacina dT. Em geral, houve um aumento gradual da população de linfócitos T_{CM} , atingindo significância estatística ($P = 0,02$) no 28º dia (Figura 4A). Paralelamente, observamos uma diminuição simultânea e gradual dos linfócitos T_{EM} , sendo esta queda significativa ($P = 0,02$) 28 dias após o *booster* (Figura 4B). Estas oscilações nas frequências das populações foram maiores quando as células foram estimuladas com o antígeno específico sendo que, no 28º dia, a população de linfócitos T_{CM} era significativamente ($P = 0,03$) maior que a de linfócitos T_{EM} , quando estimuladas com o TD.

Quanto à ativação celular, avaliada pela expressão de CD69 (Figura 5), verificamos que esta foi máxima (mediana de 3,1) 28 dias após o *booster*, tanto para os linfócitos T_{CM} (Figura 5A) quanto para os linfócitos T_{EM} (Figura 5B). Esta frequência foi cerca de 2 vezes maior que àquela observada nas amostras pré-vacinais (mediana de 1,5; $P > 0.05$).

Portanto, estes resultados foram similares aos obtidos com a vacina anti-MenB (Artigo 2), exceto pelo pico da resposta de linfócitos T_{CM} ter sido detectado 14 dias após a dose reforço. No entanto, em relação à expressão de CD69, a ativação celular induzida por VA-MENGOC-BC[®] foi significativamente maior que a induzida por dT em todos os períodos analisados e para ambas as populações celulares avaliadas (T_{EM} e T_{CM}). Essa diferença pode estar relacionada a um espaço de tempo mais curto entre a administração da dose *booster* e da imunização primária, que foi de 6 meses para a vacina anti-MenB e de pelo menos 5 anos para a vacina anti-TD.

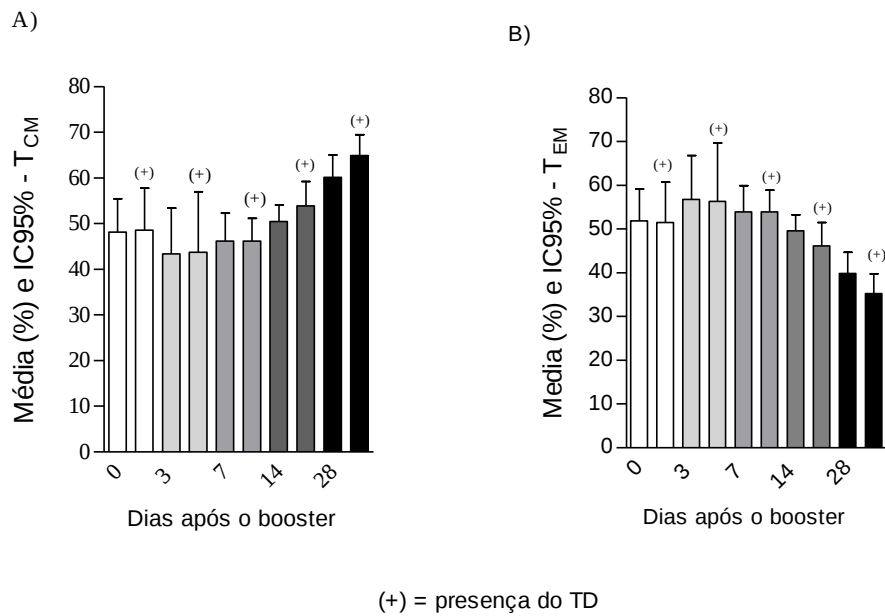


Figura 4 – Média dos percentuais de LT (CD4⁺) de memória antes e em diferentes dias (3, 7, 14 e 28) após a dose *booster* da vacina dT. As células foram estimuladas (+) ou não com o TD. T_{CM} – memória central (CD45RA⁺CCR7⁺); T_{EM} – memória efetora (CD45RA⁺CCR7⁺).

Figura 5 – Frequência das populações de LT CD4⁺ de memória expressando a molécula CD69, indicadora de ativação celular recente, após estimulação com o TD. As análises foram realizadas 3, 7, 14 e 28 dias após a dose *booster*. A) T_{CM}; B) T_{EM}. As linhas representam a mediana da população estudada.

11 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversas vacinas compostas de OMV foram desenvolvidas e utilizadas para conter surtos causados por MenB (Bjune et al., 1991; Sierra et al., 1991; Wong et al., 2009). No entanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz continua sendo um desafio em todo o mundo. Com o sequenciamento do genoma de *N. meningitidis*, a procura por um antígeno universal conservado tem sido o principal foco dos estudos em vacinas anti-MenB, utilizando como ferramenta a vacinologia reversa (Mariel et al., 2008). O sucesso ou o fracasso dessas vacinas depende da indução da resposta imune funcional em crianças e da variedade de cepas circulantes que são mortas por anticorpos bactericidas (Lo et al., 2009).

Embora a proteção contra a DM tenha sido associada ao desenvolvimento de anticorpos bactericidas, existem evidências da presença de imunidade mesmo quando anticorpos específicos não são mais detectáveis. Desta forma, outros parâmetros além dos níveis de anticorpos podem ser usados para refletir mais apropriadamente imunidade duradoura (Bernasconi et al., 2002; Nanán et al., 2002).

O objetivo desta tese foi avaliar, em modelo animal e em humanos, alguns dos mecanismos de desenvolvimento e manutenção da memória imunológica após vacinação contra MenB, utilizando como referência a vacina diftérica (dT ou DTP), considerada ter ótima eficácia em humanos.

A participação dos LB na memória imunológica engloba duas populações celulares distintas que são geradas durante as respostas imunes primárias. Uma delas se refere às ASC de vida longa, que continuam a secretar níveis elevados de imunoglobulinas por períodos de tempo prolongados após a eliminação do antígeno. A outra população é a de LBm, que tem a capacidade de proliferar rapidamente e se diferenciar em plasmócitos após a re-exposição ao antígeno, desse modo aumentando simultaneamente a frequência do precursor de LBm antígeno-específico e enriquecendo o *pool* de Igs específicas (Slifka et al., 1998; Tangye & Tarlinton, 2009).

Evidências indicam que as ASC morrem rapidamente como resultado do estresse no retículo endoplasmático que é causado pela produção de anticorpos em larga escala. No entanto, estímulos específicos para a sobrevivência destas células contribuem para a formação de nichos especiais, que aumentam a sobrevivência das mesmas, gerando ASC de vida longa. Estas células podem estar localizadas nos órgãos linfóides secundários, em tecidos inflamados ou na medula óssea (Radbruch et al., 2006).

Os resultados desta tese, em modelo animal, demonstraram que as vacinas estudadas induziram diferentes cinéticas da resposta específica de ASC após a imunização primária e após a dose reforço. Confirmando os resultados obtidos previamente (Cruz et al., 2007), quando comparada com o baço, a medula óssea foi o sítio anatômico que apresentou a maior frequência relativa de ASC anti-MenB após a imunização primária. No entanto, 4 e 6 meses após a terceira dose, houve uma importante redução de ASC específicas na medula óssea. Nestes períodos, não houve diferença entre a resposta de ASC específica no baço e na medula óssea, sendo similares àquelas detectadas após 1 e 2 doses da vacina.

Quando a dose *booster* foi administrada 2 ou 4 meses após a terceira dose, a resposta de ASC no baço foi similar àquela induzida após imunização primária, indicando a ativação dos LBm e consequente diferenciação em ASC. Em contraste, observamos uma correlação inversa entre o tempo de administração do *booster* e os níveis de ASC na medula óssea, sugerindo menor capacidade dos LBm gerarem novas ASC ou diferenças na migração de ASC para a medula óssea. A dose reforço, administrada 6 meses após a terceira dose, não foi capaz de induzir uma resposta importante de ASC tanto no baço quanto na medula. Estes dados diferem de estudos utilizando modelo viral de infecção no qual, após a eliminação da infecção e para o resto da vida do animal, a medula óssea continha > 90% de plasmócitos vírus-específicos (Slifka et al., 1998).

A resposta imune induzida pela vacina DTP foi diferente da induzida pela vacina anti-MenB. A resposta primária de ASC anti-TD foi muito menor, tanto no baço quanto na medula óssea, que a resposta primária ao MenB. Em contraste, a dose *booster* da vacina DTP administrada 4 ou 6 meses após a imunização primária induziu uma resposta muito maior que a induzida pela vacina anti-MenB. As causas dessas diferenças são desconhecidas, mas é importante considerar que a vacina anti-MenB é composta basicamente por OMP e LOS residual. Já a vacina DTP usada neste estudo é formulada com proteínas secretadas e células inteiras de *B. pertussis*, uma bactéria Gram-negativa. O LPS é um potente ativador de LB e estimula a sobrevivência de ambos os LB maduros e imaturos através da ativação de NF- κ B e prevenção da translocação de Bax, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl2 (Souvannavong et al., 2007). Uma questão que permanece é se apresentações distintas da mesma molécula como componentes das duas vacinas do presente trabalho poderiam ter efeitos diferentes *in vivo*. Em um estudo similar (Stenger et al., 2010), os autores observaram um aumento gradual da população de ASC de vida longa específicas residentes na medula óssea, sendo detectado até mesmo 1 ano após a administração de uma dose reforço da vacina DTP ou DTaP em camundongos.

ASC e LBm possuem funções distintas no processo de manutenção da memória sorológica (Lanzavecchia et al., 2006). Os LBm ficam circulando entre sangue, linfa, linfonodos e tecidos, sendo ativados na presença de antígenos ou estímulos policlonais (Bernasconi et al., 2002). Muito pouco se sabe a respeito do desenvolvimento de LBm após vacinação contra MenB. O uso de ativadores policlonais de LB em cultura de células estimula populações de LBm a se diferenciar em ASC, permitindo sua detecção pela metodologia do ELISPOT.

Em se tratando da indução de LBm anti-MenB, observamos no modelo animal, que o pico da resposta ocorreu após a terceira dose (média = 1,6%), com um ligeiro declínio nos períodos subsequentes, permanecendo em torno de 1% mesmo após as doses reforços. Em contrapartida, a resposta à dose reforço da vacina DTP foi de 1,9%, quase duas vezes maior que a induzida pela vacina VA-MEGOC-BC[®]. Estes resultados, juntamente com a resposta de ASC e de anticorpos, sugerem que os LBm anti-MenB do baço, que permaneceram em níveis constantes ao longo de todo o estudo, foram responsáveis pela forte resposta de anticorpos observada após a dose reforço. Blink et al. (2005) demonstraram que o número de LBm circulantes permaneceu constante desde o início da resposta imune, embora a afinidade dos anticorpos secretados tenha aumentado. É importante mencionar que os linfonodos dos animais vacinados em nosso estudo não foram avaliados, levantando questões acerca da possibilidade de outros órgãos linfóides secundários constituírem um reservatório adicional de LBm de vida longa.

O desenvolvimento de anticorpos bactericidas tem sido descrito como o principal mecanismo protetor contra a DM em humanos e animais e títulos ≥ 4 são considerados protetores (Goldshneider et al., 1969a). Nossos dados mostraram que a resposta de anticorpos bactericidas dos animais vacinados foi dose-dependente, sendo máxima aos 14 dias após a terceira dose (média = 5,2). Esses níveis foram mantidos por aproximadamente 2 meses (média = 3,6) e sofreram um declínio gradual nos períodos subsequentes (média = 1,6 e 0,5; 4 e 6 meses após 3 doses, respectivamente). As doses reforços, administradas 4 ou 6 meses após a imunização primária, induziram uma resposta significativa de anticorpos bactericidas quando comparadas com o pré-*booster*. De maneira interessante, o perfil da resposta de anticorpos opsonizantes e o dos títulos de anticorpos bactericidas apresentou uma forte correspondência em todos os períodos analisados. No entanto, não houve correlação estatística entre as respostas funcionais analisadas. Portanto, apesar dos baixos níveis de ASC na medula aos 4 e 6 meses pós-vacinação e do número constante de LBm no baço, estes dados mostram uma resposta de anticorpos indicadora da presença de memória imunológica.

As porinas de *Neisseria* são os principais componentes presentes nas OMVs da vacina cubana anti-MenB. A proteína PorA foi identificada como o principal alvo de anticorpos bactericidas induzidos por vacinas OMV em humanos (Milagres et al., 1998; Wedege et al., 1998; Milagres et al., 2000). Nesta tese, avaliamos a resposta de anticorpos opsonizantes contra a cepa vacinal (Cu385), a cepa homóloga (H355) e suas variantes PorA⁻ e Opa⁻. Houve um declínio significativo na resposta de anticorpos quando PorA⁻, mas não Opa⁻, foi usada como cepa alvo, indicando um papel importante de PorA na indução de anticorpos opsonizantes. Resultados similares foram obtidos previamente para o ensaio bactericida (Milagres, 1998).

Concluindo, o estudo em modelo animal demonstrou que, diferente dos modelos virais, a vacina VA-MENGOC-BC[®] não gerou plasmócitos de vida longa em níveis elevados a partir dos 4 meses após a imunização primária. A não alteração da resposta de LBm após o *booster* também indica alguma deficiência na geração e/ou reativação destas células, o que possivelmente afetou a resposta de ASC na medula. Por outro lado, a resposta de IgG e de anticorpos funcionais (bactericidas e opsonizantes) nos períodos pré e pós-*booster* indicam que os plasmócitos de vida longa e/ou os LBm circulantes, mesmo em concentrações questionáveis, foram elementos importantes na resposta de anticorpos após o *booster*. O melhor entendimento dos aspectos celulares desta resposta será importante para o aprimoramento destas vacinas com consequente manutenção da memória sorológica sem a necessidade de doses reforços frequentes.

A etapa seguinte foi investigar se os resultados obtidos em modelo animal se reproduziam em humanos. Devido a inviabilidade de acessar os plasmócitos e LBm em tecidos linfóides e na medula óssea humanos os estudos são realizados utilizando o sangue periférico. Após a imunização, mudanças rápidas ocorrem na frequência das populações de plasmócitos e LBm, uma vez que estas células se deslocam do tecido onde são produzidas para outros sítios anatômicos. O trânsito destas populações celulares através do sangue periférico após a imunização deve permitir uma estimativa relativamente precisa da frequência de tais células em outros tecidos. No entanto, o modelo e a interpretação de tais estudos requerem um entendimento da cinética das populações de LB no sangue periférico (Kelly et al., 2008). Até o presente, nenhuma abordagem acerca do desenvolvimento de memória imunológica envolvendo os mecanismos celulares foi desenvolvida após imunização com a vacina VA-MENGOC-BC[®]. Com esse estudo buscamos elucidar a geração e

manutenção de memória imunológica após imunização com a vacina cubana anti-MenB, a fim de justificar a baixa eficácia da mesma quando utilizada, na década de 90, em milhões de crianças da Grande São Paulo e Rio de Janeiro.

Os resultados obtidos com um pequeno número de voluntários vacinados demonstraram que somente após a administração da terceira dose da vacina VA-MENGOC-BC[®] foi possível detectar a presença de LBm em todos os indivíduos. Um estudo de eficácia realizado em humanos com a vacina norueguesa já havia sugerido a necessidade da terceira dose para induzir imunidade duradoura, uma vez que a eficácia vacinal passou de 87% para 57% 29 meses após a segunda dose da vacina (Bjune et al., 1991). Quando a terceira dose foi introduzida no esquema primário de imunização ou como uma dose reforço, diversos estudos apresentaram bons resultados em relação à resposta de anticorpos (Feiring et al., 2006).

Quando avaliamos a resposta de LBm 6 meses após a terceira dose, detectamos uma redução significativa e, de maneira surpreendente, apenas 2 dos 5 indivíduos analisados responderam com um aumento da frequência de LBm (média = 0,10%) 14 dias após a dose *booster*. Diferente da resposta de LBm anti-MenB, a dose reforço da vacina dT induziu um aumento importante de LBm em 6 de 7 indivíduos (média = 0,54%). A resposta de LBm induzida pela vacina diftérica após a dose reforço foi 5 vezes maior que a pré-*booster* e também 5 vezes maior que a resposta *booster* induzida pela vacina cubana. Levando em consideração que os indivíduos que receberam a dose reforço da vacina diftérica não haviam sido vacinados há pelo menos 5 anos e que o reforço da vacina cubana foi administrado cerca de 6 meses após a vacinação primária, estes dados sugerem diferentes potencialidades das vacinas estudadas em gerarem e manterem os LBm. Um estudo do efeito da dose reforço em indivíduos vacinados na adolescência com a vacina cubana está sendo desenvolvido pelo nosso grupo.

Estudos realizados por Kelly et al. (2008) avaliaram a cinética da resposta de LBm anti-MenC e anti-TD após imunização de crianças com 3 doses da vacina conjugada MenC-CRM₁₉₇, que também receberam as vacinas de rotina do calendário de vacinação infantil, o que inclui a vacina anti-diftérica. Os linfócitos de memória, assim como em nosso estudo, também foram detectados somente após a terceira dose. Esta frequência permaneceu detectável por até 30 dias após a terceira dose para ambos os antígenos avaliados. É importante mencionar que houve correlação significativa entre a resposta de LBm anti-MenC e a resposta de anticorpos 1 mês após a terceira dose da vacina, resultado que não observamos em nosso estudo.

Os resultados acerca da resposta de anticorpos funcionais indicaram que a vacina cubana anti-MenB induziu uma imunidade humoral de curta duração, assim como foi observado para a frequência de LBm. Houve um aumento gradual da resposta de anticorpos opsonizantes e bactericidas no esquema primário de imunização. Seis meses após a terceira dose, essas frequências sofreram uma redução significativa. Para a resposta de anticorpos bactericidas após a dose *booster*, houve um aumento de 4 vezes nos títulos de 3 dos 5 indivíduos estudados. Porém, a resposta pós-*booster* foi significativamente menor que a induzida pela terceira dose.

Estudos recentes a respeito da presença de LBm de vida longa específicos para tétano, pertussis, sarampo e vírus influenza estabeleceram que as frequências destas células variaram de 0,02% a 0,87% do total de células produtoras de IgG. É importante destacar que os LBm foram detectados em todos os indivíduos para todos os antígenos (Buisman et al., 2009). Embora o ensaio usado em nosso trabalho seja menos sensível que o descrito anteriormente, a cinética da resposta de LBm foi acompanhada pelas respostas de anticorpos bactericidas e opsonizantes. Um dos questionamentos que estes dados nos trazem é como os antígenos OMV de MenB poderiam mediar a indução de uma eficiente resposta de LB após a vacinação primária com uma capacidade de memória tão limitada.

A plasticidade na geração, persistência e a reativação de LT CD4⁺ de memória têm importante implicação nas estratégias vacinais de indução de imunidade protetora. A flexibilidade dos precursores dos LT CD4⁺ de memória sugere que a capacidade de gerar LTm para um determinado antígeno após imunização é bastante elevada. Além disso, a manutenção das populações de LTm a longo prazo deve ser favorecida por reforços intermitentes, uma vez que os LT CD4⁺ são mantidos por sinais recebidos pelos TCR (Lees & Farber, 2010). Distintas populações de linfócitos T CD4⁺ de memória foram descritas com base em alguns marcadores de superfície (Sallusto et al., 1999). Linfócitos T de memória efetora (T_{EM}) migram para tecidos periféricos e para sítios de inflamação. Após reencontrar um antígeno específico, essas células rapidamente exercem suas funções efetoras, fornecendo proteção imediata contra infecção ou reativação de micro-organismos. Já os linfócitos T de memória central (T_{CM}) ficam circulando entre os órgãos linfóides secundários e se diferenciam em T_{EM} após o reencontro com o antígeno. (Jackson et al., 2005).

Com o intuito de investigar essas populações celulares (T_{EM} e T_{CM}) e seu perfil de ativação após a vacinação, avaliamos a expressão dos marcadores CCR7, CD45RA e CD69 nos LT CD4⁺ provenientes de PBMC dos voluntários vacinados. Nossos dados mostraram que

o esquema primário de imunização induziu o predomínio da resposta de linfócitos T_{EM} ($CD4^+CCR7^+CD45RA^{-/+}$; média = 58%, quando estimulados com OMV), com um percentual discreto de LT ativados ($CD69^+$; média = 1,7%). Após a terceira dose da vacina a ativação celular foi maior (média = 4,1%) para os linfócitos T_{CM} ($CD4^+CCR7^+CD45RA^-$), cuja proporção foi de 42%. A dose *booster* induziu um aumento gradual dos linfócitos T_{CM} (média = 57%) e uma redução contínua dos linfócitos T_{EM} (média = 42%) até o 14º dia. De maneira interessante, ao administrar a dose reforço, ambas as populações de linfócitos (T_{CM} e T_{EM}) estavam altamente ativadas, com uma média de 13 e 9% das células expressando $CD69$, respectivamente. Após o *booster*, a ativação dos LT alcançou o pico da resposta no 14º dia para os linfócitos T_{CM} (26%) e no 28º dia para os linfócitos T_{EM} (14,6%). Quando avaliamos a resposta de LTm após a dose reforço da vacina dT, resultados similares aos obtidos com a vacina anti-MenB foram observados, exceto pelo pico da resposta de linfócitos T_{CM} ter sido detectado 28 dias após a dose reforço. No entanto, a ativação celular induzida por VA-MENGOC-BC[®] foi significativamente maior que a induzida por dT em todos os períodos analisados e para ambas as populações celulares avaliadas (T_{EM} e T_{CM}). Essa diferença pode estar relacionada a um espaço de tempo mais curto entre a administração da dose *booster* e da imunização primária, que foi de 6 meses para a vacina anti-MenB e de pelo menos 5 anos para a vacina anti-TD.

Estudos realizados por Gudmundsdotter et al. (2008) indicaram um aumento a longo-prazo de linfócitos T_{CM} específicos em pacientes infectados pelo HIV-1 após receberem 8 doses da vacina HIV-1 rgp160, administrada durante 1 ano. Assim como em nossos estudos, o aumento observado tornou-se mais evidente com o passar do tempo, apresentando uma resposta significativamente maior aos 24 e não aos 12 meses após a primeira dose da vacina. Outra pesquisa evidenciou a ativação de linfócitos T_{CM} após a dose reforço com o TT em voluntários imunizados 10 anos antes (Barbey et al., 2007). Os resultados demonstraram que houve uma expansão predominante de linfócitos T_{CM} , comparada com a subpopulação T_{EM} , após a dose reforço com o TT, cujo pico da resposta se deu aos 7 ou 14 dias. Estes resultados contrastam com outros obtidos em modelos virais (citomegalovírus ou vírus da hepatite B), que demonstraram a presença de LT $CD4^+$ específicos expressando principalmente o fenótipo T_{EM} (Bitmansour et al., 2002; Paroli et al., 2002). Esta diferença pode estar relacionada ao mecanismo pelo qual o patógeno, ao contrário de um polipeptídeo, é detectado pelo sistema imune e aos complexos e distintos sinais induzidos por tais estruturas desencadeadoras (Barbey et al., 2007).

Enfim, os resultados apresentados nesta tese sugerem que a imunização com a vacina VA-MENGOC-BC[®] induziu o desenvolvimento e ativação de LTm, porém falhou na manutenção de uma população de LBm funcionalmente estável. A fraca resposta de anticorpos após o *booster* reforça a existência de alguma deficiência da vacina em induzir ou manter os LBm. Diferente dos resultados obtidos em humanos, a resposta de anticorpos bactericidas e opsonizantes em camundongos foi reativada após a dose reforço, mesmo quando esta foi administrada 6 meses após a imunização primária. Os níveis estáveis de LBm específicos no modelo animal podem ter sido os responsáveis pela reativação da resposta de anticorpos, o que não foi observado em humanos, quando apenas 2 de 5 indivíduos apresentaram aumento da resposta de LBm após o *booster*. O modelo animal foi importante para demonstrar a presença de ASC na medula óssea, mas apresenta a particularidade de que os camundongos foram imunizados com uma única vacina, situação muito diversa dos humanos. Estes dados reforçam a necessidade de diferentes modelos animais nos estudos de imunogenicidade de vacinas e as limitações desses modelos para preverem a resposta em humanos.

Em suma, os dados desta tese indicam que 3 doses da vacina cubana anti-MenB teve uma eficiência curta em humanos e sugerem que a baixa eficácia da vacina quando utilizada na década de 90 em São Paulo e no Rio de Janeiro, pode estar relacionada à deficiência na geração e manutenção de LBm específicos.

12 CONCLUSÕES

12.1 Estudo em modelo animal

- ✖ As vacinas estudadas (VA-MENGOC-BC[®] e DTP) induziram diferentes cinéticas da resposta específica de ASC após imunização primária e após a dose *booster*.
- ✖ A medula óssea apresentou a maior frequência relativa de ASC anti-MenB após a imunização primária, predominando até 2 meses após a terceira dose. Porém, a resposta de ASC neste sítio anatômico sofreu uma importante redução e se igualou ao baço 4 e 6 meses após a terceira dose, inclusive após o *booster* (6 meses).
- ✖ Ao contrário, a resposta de ASC induzida pela vacina DTP foi menor após o esquema primário de imunização, com níveis similares detectados no baço e na medula óssea. Após o *booster*, esses resultados se inverteram, havendo uma resposta significativamente maior que a resposta primária, principalmente no baço.
- ✖ Estas diferenças podem estar associadas aos componentes distintos das vacinas em questão, com a vacina VA-MENGOC-BC[®] sendo constituída de LOS residual e a vacina DTP composta por LPS em abundância, um potente ativador de linfócitos B.
- ✖ A dose *booster* induziu uma resposta de LBm anti-TD aproximadamente duas vezes maior que a de LBm anti-MenB.
- ✖ A resposta de anticorpos bactericidas e opsonizantes dos animais vacinados contra MenB foi dose-dependente, sendo máxima aos 14 dias após a terceira dose. Diferente da resposta celular, as doses reforços, administradas 4 ou 6 meses após a imunização primária, induziram uma resposta significativa de anticorpos funcionais quando comparadas com o pré-*booster*.
- ✖ Juntamente com resposta de ASC e de anticorpos, esses resultados sugerem que os LBm anti-MenB do baço, que permaneceram em níveis constantes ao longo de todo o estudo, foram responsáveis pela forte resposta de anticorpos observada após a dose reforço.

- ✖ Com o uso de uma cepa alvo mutante (PorA⁻) foi possível atribuir à PorA um papel importante na indução de anticorpos opsonizantes anti-MenB, assim como já havia sido observado anteriormente para os anticorpos bactericidas.

12.2 Estudo em humanos

- ✖ Somente após a administração da terceira dose da vacina VA-MENGOC-BC[®] foi possível detectar a presença de LBm em todos os indivíduos, confirmando a necessidade de três doses já descrita na literatura.
- ✖ Seis meses após a imunização primária, a resposta de LBm retornou ao seu nível basal, indicando uma deficiência na manutenção da memória humoral, resultado reforçado pela não reativação dos LBm quando a dose *booster* foi aplicada.
- ✖ A vacina dT induziu um aumento importante da frequência de LBm após a dose reforço, sendo 5 vezes maior que a induzida pela vacina cubana.
- ✖ Em relação aos anticorpos funcionais a vacina VA-MENGOC-BC[®] induziu uma imunidade humoral de curta duração, com redução significativa 6 meses após a imunização primária, e pequena reativação após a dose reforço.
- ✖ O esquema primário de imunização induziu o predomínio da resposta de linfócitos T_{EM} anti-MenB. A dose *booster* induziu um aumento gradual dos linfócitos T_{CM} e uma redução contínua dos linfócitos T_{EM}, específicos para MenB ou para TD.
- ✖ A ativação celular induzida por VA-MENGOC-BC[®] foi significativamente maior que a induzida por dT em todos os períodos analisados e para ambas as populações celulares avaliadas (T_{EM} e T_{CM}), diferença que pode estar relacionada a um espaço de tempo mais curto entre a administração da dose *booster* e da imunização primária, que foi de 6 meses para a vacina anti-MenB e de pelo menos 5 anos para a vacina anti-TD.
- ✖ Enfim, este estudo demonstrou que a imunização com a vacina VA-MENGOC-BC[®] induziu o desenvolvimento e ativação de LTm em todo o período estudado. Porém, a vacina foi menos eficiente na manutenção de uma população de LBm funcionalmente

estável, sugerindo que a baixa eficácia da vacina cubana anti-MenB pode estar relacionada à deficiência na geração/manutenção dessas células.

REFERÊNCIAS

- Alinikula J, Lassila O. Gene interaction network regulates plasma cell differentiation. *Scand J Immunol* 2011; 73: 512-9.
- Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007; 27: 190-202.
- Almeida-González L, Paredes CF, Pérez LF, Preciado JIS. Enfermedad por meningococo, *Neisseria meningitidis*: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. *Salud Publica Mex* 2004; 46: 438-50.
- Artenstein MS, Gold R, Zimmerly JG, Wyle FA, Schneider H, Harkins C. Prevention of meningococcal disease by group C polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1970; 282: 417-20.
- Barbey C, Pradervand E, Barbier N, Spertini F. Ex vivo monitoring of antigen-specific CD4⁺ T cells after recall immunization with tetanus toxoid. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(9): 1108-16.
- Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 2002; 298: 2199-202.
- Bitmansour AD, Douek DC, Maino VC, Picker LJ. Direct ex vivo analysis of human CD4⁺ memory T-cell activation requirements at the single clonotype level. *J Immunol* 2002; 169: 1207-18.
- Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991; 338: 1093-6.
- Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med* 2005; 201: 545-54.
- Bovre K. Neisseriaceae. In: Krieg NR & Holt JG ed *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, 1984. Vol 1. P. 288-96.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 597/GM, de 08 de abril de 2004. Institui em todo território nacional, os calendários de vacinação. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 12 abr. 2004. Seção 1, p. 69.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, CENEPI. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, *Informes Técnicos Institucionais*, 2009.
- Brodeur BR, Larose Y, Tsang P, Hamel J, Ashton F, Ryan A. Protection against infection with *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b by passive immunization with serotype-specific monoclonal antibody. *Infect Immun* 1985; 50: 510-6.

Buisman AM, de Rond CG, Oztürk K, Ten Hulscher HI, van Binnendijk RS. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine* 2009; 28: 179-86.

Cartwright K, Morris R, Rumke H, Fox A, Borrow R, Begg N, et al. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* 1999; 17: 2612-9.

Cartwright KAV. Bacterial meningitis, Chapter 17. *In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed. Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Oxford University Press: New York; 1996. P. 299–318.

Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol* 2003; 171: 4969-73.

Cruz SC, Cruz AC, Oliveira JM, Soares AM, Gioia CA, Milagres LG. Generation of long-lived plasma cells to serogroup B *Neisseria meningitidis* after murine immunisation with an outer membrane protein vaccine. *Vaccine* 2007; 25 (27): 5046-52.

Cruz SC, Silva GP, Sampaio FJ, Souza SL, Dias AASO, Milagres LG. Comparison of long-term humoral memory development after immunisation against *Neisseria meningitis* B or diphtheria toxoid. *Vaccine* 2010; 28: 6841-6.

Cruz SC, Souza SL, Cruz AC, Silva GP, Milagres LG. Human antibody and memory B and T-cell responses after primary and booster immunisation against *Neisseria meningitidis* B. *Vaccine*. No prelo 2011.

Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 127-59.

D'Amelio R, Agostoni A, Biselli R, Brai M, Caruso G, Cicardi M, et al. Complement deficiency and antibody profile in survivors of meningococcal meningitis due to common serogroups in Italy. *Scand J Immunol* 1992; 35: 589-95.

Davis MM. T cell receptor gene diversity and selection. *Anu Rev Biochem* 1990; 59: 475-96.

De Kleijn ED, de Groot R, Lafeber AB, Labadie J, van Limpt KC, Visser J, et al. Immunogenicity and safety of monovalent p1.7(h),4 meningococcal outer membrane vesicle vaccine in toddlers: comparison of two vaccination schedules and two vaccine formulations. *Vaccine* 2000; 19: 1141-8.

Diaz Romero J, Outschoorn IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 559-75.

Djibo S, Nicolas P, Alonso JM, Djibo A, Couret D, Riou JY et al. Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995–2000. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 1118-23.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 201-23.

Emonts M, Hazelzet JA, de GR, Hermans PW. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 565-77.

Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin Immunol* 2008; 20: 49-58.

Feiring B, Fuglesang J, Oster P, Naess LM, Helland OS, Tilman S, et al. Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 790-6.

Ferriani VP, Barbosa JE, de Carvalho IF. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. *Acta Paediatr* 1999; 88: 1062-6.

Findlow J, Borrow R, Snape MD, Dawson T, Holland A, John TM, et al. Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant Meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy. *Clin Infect Dis* 2010; 51(10): 1127-37.

Finne J, Finne U, Deagostini-Bazin H, Goridis C. Occurrence of a α 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 482-7.

Finne J, Leinonem M, Makela PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 1983; 2: 355-7.

Fransen F, Boog CJ, van Putten JP, van der Ley P. Agonists of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 are candidates for use as adjuvants in an outer membrane vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Infect Immun* 2007; 75: 5939-46.

Fransen F, Stenger RM, Poelen MC, van Dijken HH, Kuipers B, Boog CJ, et al. Differential effect of TLR2 and TLR4 on the immune response after immunization with a vaccine against *Neisseria meningitidis* or *Bordetella pertussis*. *PloS One* 2010; 5(12): e15692.

Frasch CE. Development of meningococcal serotyping. In: Vedros, NA. *Evolution of meningococcal disease*. Flórida, CRC Press 1987; p. 39-54.

Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Difteria: situação atual da doença; 2002. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/guia-epi/htm/doencas/difteria/index.htm>. Acesso em: 23 abr. 2009.

Galazka A. The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 1: S2-9.

Galloway Y, Stehr-Green P, McNicholas A, O'Hallahan J. Use of an observational cohort study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years. *Int J Epidemiol* 2009; 38: 413-8

Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. *Vaccine* 2006; 24: 4692-700.

- Giuliani MM, Adu-Bobie J, Comanducci M, Aricò B, Savino S, Santini L, et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 10834-9.
- Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J Clin Invest* 1975; 56: 1536-47.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969a; 129: 1307-26.
- _____. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* 1969b; 129: 1327-48.
- Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol* 2010; 185: 3117-25.
- Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969; 129: 1367-84.
- Granoff DM. Relative importance of complement-mediated bactericidal and opsonic activity for protection against meningococcal disease. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 2: B117-25.
- Gudmundsdottir L, Boström AC, Burton C, Rosignoli G, Sandström E, Hejdeman B, et al. Long-term increase of CD4⁺ central memory cells in HIV-1-infected individuals by therapeutic HIV-1 rgp160 immunization. *Vaccine* 2008; 26(40): 5107-10.
- Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 2001; 194: 45-56.
- Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A, et al. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol* 2002; 169: 1277-82.
- Ingalls RR, Lien E, Golenbock DT. Differential roles of TLR2 and TLR4 in the host response to Gram-negative bacteria: lessons from a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis*. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 411-5.
- Jack DL, Cole J, Naylor SC, Borrow R, Kaczmarski EB, Klein NJ, et al. Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein-A2 increases susceptibility to meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1426-33.
- Janeway Jr CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- Jodar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet* 2002; 359: 1499-508.

Jones DM, Borrow R, Fox AJ, Gray S, Cartwright KA, Poolman JT. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1992; 13: 219-24.

Kahler CM, Stephens DS. Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit Rev Microbiol* 1998; 24: 281-334.

Kelly DF, Pollard AJ, Moxon ER. Immunological memory: the role of B cells in long-term protection against invasive bacterial pathogens. *Jama* 2005; 294: 3019-23.

Kelly DF, Snape MD, Clutterbuck EC, Green S, Snowden C, Diggle L, et al. CRM₁₉₇-conjugated serogroup C meningococcal capsular polysaccharide, but not the native polysaccharide, induces persistent antigens specific memory B cells. *Blood* 2006; 108: 2642-7.

Kelly DF, Snape MD, Perrett KP, Clutterbuck EA, Lewis S, Rohner GB, et al. Plasma and memory B-cell kinetics in infants following a primary schedule of CRM₁₉₇-conjugated serogroup C meningococcal polysaccharide vaccine. *Immunology* 2008; 127: 134-43.

Kornelisse RF, Hack CE, Savelkoul HFJ, van der Pouw Kraan TC, Hop W, van Mierlo G, et al. Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis. *Infect Immun* 1997; 65: 877-81.

Lambert PH, Liu M, Siegrist CA. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune response? *Nat Med* 2005; 11 (4 Suppl): S54-62.

Lanzavecchia A, Bernasconi N, Traggiai E, Ruprecht CR, David Corti, Sallusto F. Understanding and making use of human memory B cells. *Immunol Rev* 2006; 211: 303-9.

Lapeysonnie, L., 1963. La méningite cérébrospinale en Afrique. *Bull. World Health Organ.* 28, 1–114.

Larrauri A, Cano R, Garcia M, Mateo S. Impact and effectiveness of meningococcal C conjugate vaccine following its introduction in Spain. *Vaccine* 2005; 23: 4097–100.

Lassiter HA, Watson SW, Seifring ML, Tanner JE. Complement factor 9 deficiency in the serum of neonates. *J Infect Dis* 1992; 166: 53-7.

Lees JR, Farber DL. Generation, persistence and plasticity of CD4 T-cell memories. *Immunology* 2010; 130: 463-70.

Lehmann AK, Halstensen A, Holst J, Bassøe CF. Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediators of human opsonophagocytosis. *J Immunol Methods* 1997; 200(1-2): 55-68.

Lesse AJ, Campagnari AA, Bittner WE, Apicella MA. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium docetyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Met* 1990; 126:109-17.

Leyendeckers H, Odendahl M, Löhndorf A, Irsch J, Spangfort M, Miltenyi S, et al. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1406-17.

Lifely MR, Moreno C, Lindon JC. An integrated molecular and immunological approach towards a meningococcal group B vaccine. *Vaccine* 1987; 5: 11-26.

Lo H, Tang CM, Exley RM. Mechanisms of avoidance of host immunity by *Neisseria meningitidis* and its effects on vaccine development. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 418-27.

Longworth E, Borrow R, Goldblatt D, Balmer P, Dawson M, Andrews N, et al. Avidity maturation following vaccination with a meningococcal recombinant hexavalent PorA OMVs vaccine in UK infants. *Vaccine* 2002; 20: 2592-6.

Luijckx TA, van Gaans-van den Brink JA, van Dijken HH, van den Dobbelsteen GP, van Els CA. Hyperproliferation of B cells specific for a weakly immunogenic PorA in a meningococcal vaccine model. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1598-605.

Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:7-19.

Manz RA, Thiel A, Radbruch A. A lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 1997; 388: 133-4.

Mariel DG, Scarselli M, Serino L, Mara M, Rappuoli, Massignani V. Genoma-based vaccine development: a short cut for the future. *Hum Vaccin* 2008; 4: 184-8.

Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson KBJ, Haraken HS, Dykes JK, et al. Standardization and a multilaboratory comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup A and C serum bactericidal assays. *Clin Diag Lab Immunol* 1997; 2:132-7.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7.

Milagres LG. Anticorpos bactericidas contra *Neisseria meningitidis* B após vacinação ou infecção invasiva [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1998.

Milagres LG, Gorla MCA, Rebelo MC, Barroso DE. Bactericidal antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup B in patients with bacterial meningitis: effect of immunization with an outer membrane protein vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28: 319-27.

Milagres LG, Gorla MCA, 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* 1998; 66: 4755-61.

Milagres LG, Ramos SR, Sacchi D, Melles CE, Vieira VS, Sato H, et al. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine. *Infect Immun* 1994; 62: 4419-24.

- Minges WolsHa, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol* 2002; 169: 4213-21.
- Moller AS, Bjerre A, Brusletto B, Joo GB, Brandtzaeg P, Kierulf P. Chemokine patterns in meningococcal disease. *J Infect Dis* 2005; 191: 768-75.
- Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in São Paulo. *Lancet* 1992; 340: 1074-8.
- Morais JS, Munford RS, Risi JB, Antezana E, Feldman RA. Epidemic disease due to serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo Brazil. *J Infect Dis* 1974; 139: 568-71.
- Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine* 2002; 20: 666-87.
- Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 265-70.
- Næss LM, Oftung F, Aase A, Wetzler LM, Sandin R, Michaelsen TE. Human T-cell responses after vaccination with the Norwegian group B meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 1998; 66: 959-65.
- Nanan R, Heinrich D, Frosch M, Kreth HW. Acute and long-term effects of booster immunization on frequencies of antigen-specific memory-B lymphocytes. *Vaccine* 2002; 20:498-504.
- Nutt SL, Tarlinton DM. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 2011; 131: 472-7.
- Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* 2010; 237: 140-59.
- Paroli M, Accapezzato D, Francavilla V, Insalaco A, Plebani A, Balsano F, et al. Long-lasting memory-resting and memory-effector CD4⁺ T cells in human X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 2002; 99: 2131-7.
- Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J Exp Med* 2006; 203:1081-91.
- Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4⁺ effector and central memory T cells. *Nat Immunol* 2011; 131 (6): 467-71.
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000; 287: 1816–20.
- Plested JS, Granoff DM. Vaccine-induced opsonophagocytic immunity to *Neisseria meningitidis* group B. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 799-804.

Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2001; 19: 1327-46.

Pollard AJ, Galassini R, van der Voort EM, Hibberd M, Booy R, Langford P, et al. Cellular immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. *Infect Immun* 1999; 67: 2452-63.

Popovic T, Ajello G, Facklam R; World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumonia* and *Haemophilus influenzae*; 1999. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/meningitis/whocdscsredc997.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2011.

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KGC, Dörner T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 741-50.

Ramsay ME, Andrews NJ, Trotter CL, Kaczmarski EB, Miller E. Herd immunity from meningococcal serogroup C conjugate vaccination in England: database analysis. *BMJ* 2003; 326: 365-6.

Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001; 410: 101-5.

Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S. Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 510-1.

Rosenqvist E, Høiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 1995; 63: 4642-52.

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes M. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 1378-88.

Ross SC, Densen P. Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63: 243-73.

Sacchi CT, Pessoa LL, Ramos SR, Milagres LG, Camargo MC, Hidalgo NT, et al. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. *J Clin Microbiol* 1992; 130: 1734-8.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 745-63.

Schmitt C, Villwock A, Kurzai O. Recognition of meningococcal molecular patterns by innate immune receptors. *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 9-20.

Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 156-64.

Schwartz B, Moore PS, Brome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. Clin Microbiol Rev 1989; 2 Suppl: S118-24.

Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. Nat Immunol 2003; 4: 835-42.

Shapiro-Shelef M, Lin KI, Savitsky S, Liao J, Calame K. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. J Exp Med 2005; 202: 1471-6.

SINAN/SVS/MS – Sistema Nacional de Agravos Notificáveis, Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Rev Saúde Pública 2005; 39: 139-40.

Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. NIPH Ann 1991; 14: 195-207.

Slifka MK, Ahmed R. Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. Trends Microbiol 1996; 4: 394-400.

_____. B cell responses and immune memory. Dev Biol Stand 1998; 95: 105-15.

Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity 1998; 8: 363-72.

Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. J Virol 1995; 69: 1895-902.

Snape MD, Pollard AJ. Meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines. Lancet Infect Dis 2005; 5: 21-30.

Souvannavong V, Saidji N, Chaby R. Lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* activates NF-kappaB through both classical and alternative pathways in primary B Lymphocytes. Infect Immun 2007; 75: 4998-5003.

Stenger RM, Smits M, Kuipers B, van Gaans-van den Brink J, Poelen M, Boog CJ, et al. Impaired long-term maintenance and function of *Bordetella pertussis* specific B cell memory. Vaccine 2010; 28(40): 6637-46.

Stephens DS. Uncloaking the meningococcus: Dynamics of carriage and disease. Lancet 1999; 353: 941-2.

Stephens DS. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. Vaccine 2009; 27 Suppl 2: B71-7.

_____. Protecting the herd: the remarkable effectiveness of the bacterial meningitis polysaccharide-protein conjugate vaccines in altering transmission dynamics. Trans Am Clin Climatol Assoc 2010; 122: 115-23.

Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. Lancet 2007; 369: 2196-210.

- Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosal: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J infect Dis* 1983; 148: 369-76.
- Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2065-75.
- Tarlinton D. B-cell memory: are subsets necessary? *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 785-90.
- Tibby SM, Murdoch IA, Durward A. Mortality in meningococcal disease: please report the figures accurately. *Arch Dis Child* 2002; 87: 559.
- Tokoyoda K, Zehentmeier S, Hegazy AH, Albrecht I, Grün JR, Löhning M, et al. Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity* 2009; 30: 1-10.
- Tommassen J, Vermeij P, Struyve M, Benz R, Poolman JT. Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1(PorA) and class 3 (PorB) outer membrane proteins. *Infect Immun* 1990; 58: 1355-9.
- Tough DF, Sprent J. Immunological memory. In: *Fundamental Immunology* (William E Paul Ed.), 2003, pp 865-99. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Trotter CL, Andrews NJ, Kaczmarek EB, Miller E, Ramsay ME. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet* 2004; 364: 365-7.
- Trotter CL, Edmunds WJ, Ramsay ME, Miller E. Joint Committee on Vaccines and Immunisation. Proposed changes to the routine childhood immunization schedule, 2006. *Hum Vaccin* 2006; 2: 68-73.
- Trotter C, Findlow J, Balmer P, Holland A, Barchha R, Hamer N, et al. Seroprevalence of bactericidal and anti-outer membrane vesicle antibodies to *Neisseria meningitidis* group B in England. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 863-8.
- Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 1981; 146: 69-78.
- Tsai CM, Mocca LF, Frasch CE. Immunotype epitopes of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide types 1 through 8. *Infect Immunol* 1987; 55: 1652-6.
- Vermont C, van den Dobbelsteen G. *Neisseria meningitidis* serogroup B: laboratory correlates of protection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34: 89-96.
- Virji M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 274-86.
- Wedge EE, Høiby EA, Rosenqvist E, Bjune G. Immune responses against major outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* in vaccines and controls who contracted

meningococcal disease during the Norwegian serogroup B protection trial. *Infect Immun* 1998; 66: 3223-31.

Welsch JA, Granoff D. Immunity to *Neisseria meningitidis* group B in adults despite lack of serum bactericidal antibody. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1596-602.

Wetzler LM, Ho Y, Reiser H. Neisserial porins induce B lymphocytes to express costimulatory B7-2 molecules and to proliferate. *J Exp Med* 1996; 183(3): 1151-9.

Wiertz EJHJ, Delvig A, Donders EMLM, Brugghe HF, van Unen LMA, Timmermans HAM, et al. T-cell responses to outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*: comparative study of the Opa, Opc, and PorA proteins. *Infect Immun* 1996; 64: 298-304.

Wong SH, Lennon DR, Jackson CM, Stewart JM, Reid S, Ypma E, et al. Immunogenicity and tolerability in infants of a New Zealand epidemic strain meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(5): 385-90.

Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004; 53: 821-32.

Zimmer SM, Stephens DS. Serogroup B meningococcal vaccines. *Curr Opin Invest Drugs* 2006; 7: 733-9.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

PROJETO: Avaliação dos mecanismos de desenvolvimento e manutenção de memória imunológica após imunização contra *Neisseria meningitidis* B com a vacina VA-MENGOC-BC[®]

OBJETIVO DO ESTUDO

Esta pesquisa quer avaliar com as amostras de sangue coletadas:

1. A presença de anticorpos contra *Neisseria meningitidis* B (MenB).
2. A presença de células produtoras de anticorpos anti-MenB.
3. A memória imunológica dos linfócitos T e dos linfócitos B anti-MenB.
4. A proliferação dos linfócitos T específicos.

Com cerca de 15 ml de seu sangue faremos esta pesquisa. Os estudos serão realizados após diferentes doses da vacina VA-MENGOC-BC[®].

CONSENTIMENTO

Eu, _____, autorizo a coleta e utilização de sangue para a pesquisa citada acima. Foram-me explicitadas as informações sobre os objetivos da pesquisa. Eu entendo que a minha participação é totalmente voluntária.

Assinatura do Doador
ou Responsável

_____/_____/_____
Data

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao doador. Até onde eu possa determinar, ele (a) entende o objetivo do presente estudo.

Assinatura do Responsável
pela Entrevista com o Doador

_____/_____/_____
Data

ANEXO B – Documento de aprovação do estudo pelo CEP-HUPE-UERJ

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 04 de Fevereiro de 2011

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

Prof.: Wille Oigman

Para: Coord. Profa. Lucimar Gonçalves Milagres / Imunologia

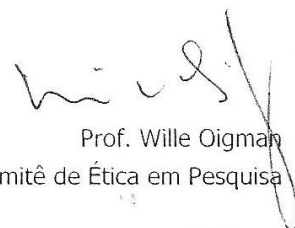
Registro CEP/HUPE: 2743/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)

CAAE: 0187.0.228.000-10

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "DESENVOLVIMENTO DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA APÓS VACINAÇÃO OU INFECÇÃO POR *NEISSERIA MENINGIDITIS*" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.



Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UERJ

ANEXO C – Documento de aprovação do estudo pelo CEA-UERJ



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
(CEUA – IBRAG - UERJ)

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/038/2010** sobre "**Desenvolvimento de memória imunológica após vacinação contra *Neisseria meningitidis* B**", sob a responsabilidade de **Lucimar Gonçalves Milagres (UERJ)**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ em **21/09/2010**. Este certificado expira em **21/09/2014**.

Rio de Janeiro, 21 de Setembro de 2010.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Patricia Cristina Lisboa da Silva
do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8

/ass