

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAFAELLA FABIANA CARNEIRO PEREIRA

“ESTABELECIMENTO DE MODELOS CELULARES PARA  
ANÁLISE *IN VITRO* DOS MECANISMOS DE VIRULÊNCIA DE  
*NEISSERIA MENINGITIDIS*”

|  |
|--|
| Este exemplar corresponde à redação final<br>da tese defendida pelo(a) candidato (a)<br><u>Rafaela Fabiana C. Pereira</u><br><u>Marcelo</u><br>e aprovada pela Comissão Julgadora. |
|--|

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

|              |  |
|--------------|--|
| <b>P414e</b> | <p>Pereira, Rafaella Fabiana Carneiro<br/>Estabelecimento de modelos celulares para a análise <i>in vitro</i> dos mecanismos de virulência de <i>Neisseria meningitidis</i> / Rafaella Fabiana Carneiro Pereira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Marcelo Lancellotti.<br/>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Neisseria meningitidis</i>. 2. Meningite bacteriana. 3. Barreira hematoencefálica. 4. Modelos <i>in vitro</i>. I. Lancellotti, Marcelo, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p> |
|--------------|--|

**Título em inglês:** Stabilishment of cellular models in order to an *in vitro* analysis of *Neisseria meningitides* mechanisms of virulence.

**Palavras-chave em inglês:** *Neisseria meningitidis*; Bacterial meningitis; Blood-brain barrier; *In vitro* models.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Marcelo Lancellotti, Daniele Ribeiro de Araújo, Fabiana Fantinatti-Garboggini.

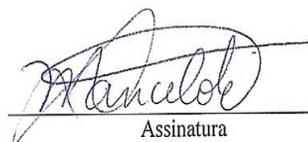
**Data da defesa:** 28/01/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 28 de Janeiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo



Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini



Assinatura

Profa. Dra. Patrícia Moriel

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura

**“A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”**

Mário Quintana

## **Agradecimentos**

Ao Prof Dr Marcelo Lancellotti. Professor e amigo. Agradeço pela orientação, entusiasmo, paciência e compreensão em todos os momentos. Obrigada por me ajudar a descobrir o curioso mundo da pesquisa e por me fazer perceber que a pesquisa pode ser, além de tudo, divertida e intrigante.

À Profª Drª Daniele Ribeiro de Araújo, pela participação nas bancas de qualificação e examinadora, amizade e contribuir de forma significativa para a finalização deste trabalho.

À Profª Drª Fabiana Fantinatti-Garboggini, por participar da banca examinadora e dedicar parte de seu tempo à análise do texto com ponderações pertinentes.

As Profª Drª Carmen Veríssima Ferreira e Profª Drª Luciana Bolsoni Lourenço, pela participação na banca de qualificação e contribuição para este trabalho com colocações de grande valia.

À Profª Drª Patricia Moriel e ao Prof Dr Sergio Marangoni, pela atenção e por aceitarem a participar da banca de qualificação.

Ao Prof Dr Wanderley Dias da Silveira, por aceitar a participar da banca examinadora, pelo exemplo e amizade.

Aos professores e funcionários da SCPG-BFM, pelo auxílio e conhecimentos transmitidos.

À Drª Luciana Maria de Hollanda, pela colaboração, atenção, amizade e pelos momentos de distração durante todos esses anos.

Ao LABIOTEC, meus colegas de laboratório, Gisele Cury, Danilo Antonini, Renan Kosseki, Mário Izidoro Júnior, Flávia Luna Lima, Alice Tavares e Ives Bernadelli de Mattos, pelos momentos de colaboração e distração. Obrigada por tudo.

Agradecimento especial aos meus queridos amigos Danielle Yahn, Marcus Corat e Daniel Ferreira de Lima Neto, pela amizade, risadas, conselhos e companheirismo.

As minhas amigas e fiéis escudeiras Larissa Yuri Ishizu, Marinanna Teixeira de Pinho Favaro, Rafaela Jorge Trad, Raíssa Estrela Curado e Sarah Azoubel Lima, pelo

companheirismo, risadas, choros, histórias, conversas e confissões. Obrigada por estarem presentes em minha vida.

À minha amiga Tatiana Mitsusaki Xavier Ricci, por estar sempre ao meu lado, apesar da distância geográfica, nos bons e maus momentos nesses 12 anos de amizade. Adoro-te.

À minha família, minha avó Eva e minha irmã Marcella, pelo amor, carinho, apoio e pelo encorajamento ao longo de todos esses anos, permitindo-me buscar os meus objetivos e sonhos.

Aos meus pais, Márcia e Ademir, ao meu irmão Gabriel, a minha tia Rose e a todos meus familiares, obrigada.

A CAPES e a FAPESP, pelo fornecimento da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro enquanto produzi este trabalho, respectivamente.

A UNICAMP, por permitir novamente que eu conquiste outro objetivo em seus domínios.

E a todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada!

## **Resumo**

*Neisseria meningitidis*, ou meningococo, é uma bactéria comensal da nasofaringe humana. Contudo, algumas linhagens meningocócicas ocasionalmente ultrapassam a mucosa respiratória e a barreira hematoencefálica e causam enfermidades como meningite e septicemia. Como a espécie humana é o único hospedeiro natural para esse patógeno, estudos *in vitro* com modelos celulares são uma ferramenta importante para a análise da interação entre o meningococo e seu hospedeiro. Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes linhagens de *N. meningitidis* na adesão celular, morfologia e expressão de quimiocinas inflamatórias em culturas *in vitro* de células humanas. Tais parâmetros também foram avaliados em um sistema *in vitro* de co-cultura celular entre células de origem nervosa e endotelial a fim de mimetizar a barreira hematoencefálica humana. Os resultados obtidos indicam que a adesão de diferentes linhagens bacterianas em células humanas de sítios específicos do processo infeccioso do meningococo, como Hep-2 (laringe), NCIH460 (pulmão), Hec1b (endotelial) e NG97 (neuroglia) foi capaz de mimetizar o processo fisiopatológico deste microrganismo. Em condições *in vitro*, células de origem nervosa mostraram-se mais suscetíveis à infecção nos parâmetros avaliados como uma elevada expressão de TNF- $\alpha$ , quimiocina característica em infecções meningocócicas. A linhagem B4 destacou-se entre as linhagens meningocócicas estudadas, apresentando elevados percentuais de adesão em células humanas com valor máximo de adesão em NG97. Células HEp-2 apresentaram poucas alterações morfológicas significativas frente à infecção por *N. meningitidis*. Tais resultados podem estar associados ao fato do trato respiratório superior ser o habitat natural do meningococo, no qual a interação entre este patógeno e as células hospedeiras seja comensal e não-invasiva. O modelo mimético de barreira hematoencefálica, realizado em transwell, indicou comunicação entre as células que o

compõem e uma maior expressão dos níveis de quimiocinas inflamatórias quando comparada à infecção desta bactéria por cada uma das células estudadas isoladamente. Tal modelo foi capaz de mimetizar a barreira hematoencefálica, fato o que torna possível sua aplicação em estudos da passagem de fármacos e outros patógenos por essa barreira.

## **Abstract**

*Neisseria meningitidis*, or meningococci, is a commensal bacterium of the human nasopharynx. However, occasionally some meningococcal strains can cross the respiratory mucosa and the blood-brain barrier and cause life-threatening diseases such as meningitis and septicaemia. Since the human species is the only natural host for this pathogen, *in vitro* studies with cellular models are an important tool for the analysis of the meningococci and its host. The aim of this present work was to value the influence of several strains of *N. meningitidis* in cellular adhesion, morphology and inflammatory chemokines expression in human cells cultivated *in vitro*. These parameters were also evaluated in a co-cultivated cellular system with glial and endothelial cells aiming mimicking the human blood brain barrier. The results indicate that the adhesion of different bacterial strains from specific sites of infectious process of meningococci as Hep-2 (larynges), NCIH460 (lung), Hec1b (endothelial) and NG97 (glial cells) was capable of mimicking, partially, the pathophysiology of this microorganism. In *in vitro* conditions, cells from nervous origin showed more susceptibility to infection than others in this evaluated parameters such as a high TNF- $\alpha$  expression, a common chemokine in meningococcal diseases. The B4 strain distinguished from the others by presenting high rates of adhesion in human cells with maximum value on NG97. HEp-2 cells showed few expressive morphologic alterations after meningococcal infection. These results may be associated with the fact that the upper human respiratory tract is the meningococci natural habitat, in which the interaction between this pathogen and host cells are commensal and not-invasive. The mimicking blood-brain barrier model, performed in transwell, has demonstrated some communication between the cells and greater expression of inflammatory chemokines when compared to the infection in isolated cells. This model was capable of mimicking the blood-brain barrier, which

makes its application possible in studies of drugs and others pathogens who might crossover though this barrier.

**Lista de Abreviaturas**

$\mu$ L: microlitro

$\mu$ m: micrometro

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenina trifosfato

A549: célula imortalizada de carcinoma epithelial humano

BHE: Barreira Hematoencefálica

BHI: Brain Heart Infusion

CEACAM: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule

CD46: receptor celular humano encontrado em grandes quantidades em células nervosas da barreira hematoencefálica

CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono

Ct: threshold cycle

DNA: ácido desoxirribonucléico

DEPC: dietilpirocarbonato

DMSO: dimetil sulfoxido

ET: electroforetic type

g: gramas

GAPDH: D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

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

GFAP: protein glial fibrilar ácida

Hec-1B: célula imortalizada de adenocarcinoma de endométrio humano

HEp-2: célula imortalizada de carcinoma de laringe humano

HL60: célula imortalizada de linhagem promielocítica humana

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

INF- $\gamma$ : interferon gamma

INCQS-FIOCRUZ: Instituto Nacional de Controle e Qualidade – Fundação Oswaldo Cruz

JAM: junctional adhesion molecule

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: dihidrogenofosfato de potássio

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: hidrogenofosfato de potássio

LOS: lipooligossacarideo

mL: mililitro

MLEE: multilocus enzyme electrophoresis

MLST: multilocus sequence typing

m/v: massa por volume

NCI H460: linhagem imortalizada de carcinoma pulmonar humano

NF $\kappa$ B: fator nuclear kappa B

NG97: célula imortalizada de glioblastoma humano

NSCLC: non-small cell lung cancer

Opa: proteína de Opacidade

PBP2: penicillin-binding protein 2

qRT-PCR: quantitative Real Time PCR

RNA: ácido ribonucleico

SFB: Soro Fetal Bovino

ST: sequence type

SNC: Sistema Nervoso Central

S100: família de proteínas presente em determinados tipos de células como as derivadas da crista neural

TNF- $\alpha$ : fator alfa de necrose celular

TRL: Toll like receptor

UFC: Unidade formadora de colônia

v/v: volume por volume

### **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas neste trabalho

Tabela 2. Lista de Oligonuclotídeos utilizados para qRT-PCR

### **Lista de Figuras**

Figura 1. Associações celulares que compõem a Barreira Hematoencefálica

Figura 2. Micrografias das linhagens utilizadas no trabalho. Células HEp-2 (A), NCI H460 (B), Hec-1B (C) e NG97 (D). Aumento de 1000 X.

Figura 3. Esquema representativo da metodologia em comum para a obtenção do percentual de adesão de *N. meningitidis*, análise de alteração morfológica e determinação do perfil de expressão de quimionas inflamatórias em células submetidas à infecção por esse patógeno

Figura 4. Metodologia utilizada para obtenção do percentual de adesão de *N. meningitidis* em culturas celulares.

Figura 5. Demonstração esquemática de poços de co-cultura de células Hec-1B (origem endotelial) e NG97 (origem nervosa) sem (A) e com (B) células HL60 (origem granulocitária).

Figura 6. Percentual de adesão de diferentes linhagens de *N. meningitidis* em células HEp-2, NCI H460, Hec-1B e NG97.

Figura 7. Percentual de alteração da morfologia de células NCI H460, Hec-1B e NG97 após infecção com diferentes linhagens de *N. meningitidis*

Figura 8 Células HEp-2 (A), células HEp-2 após ensaio de adesão com *N. meningitidis* C2135 (B), B4 (C), P2181 (D), P2143 (E) e P2498 (F). Aumento de 400 X.

Figura 9. Células NCI H460 (A), células NCI H460 após ensaio de adesão com *N. meningitidis* B ATCC (B), B4 (C), P2354 (D), P2143 (E) e Y USA (F). Aumento de 1000 X.

Figura 10. Células Hec-1B (A), células Hec-1B após ensaio de adesão com *N. meningitidis* B ATCC (B), W135 ATCC (C), B4 (D), B epidêmica (E) e P2181 (F). Aumento de 1000 X.

Figura 11. Células NG97 (A), células NG97 após ensaio de adesão com *N. meningitidis* C2135 (B), W135 ATCC (C), P2143 (D), IAL 2443 (E) e Y USA (F). Aumento de 1000 X.

Figura 12. Células NG97 em transwell (A), células NG97 em transwell após infecção do inserto superior de Hec-1b com *N. meningitidis* C2135 (B), W135 ATCC (C), B4(D). Aumento de 1000 X.

Figura 13. Células NG97 em transwell (A), células NG97 em transwell após infecção do inserto superior de Hec-1b e HL60 com *N. meningitidis* C2135 (B), W135 ATCC (C), B4(D). Aumento de 1000 X.

Figura 14. Avaliação da expressão de quimiocinas em células HEp-2: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC.

Figura 15. Avaliação da expressão de quimiocinas em células NCI H460: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta

linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC.

Figura 16. Avaliação da expressão de quimiocinas em células Hec-1B: Valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC.

Figura 17. Avaliação da expressão de quimiocinas em células NG97: Valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC.

Figura 18. Avaliação da expressão de quimiocinas em células NG97 no ensaio de transwell com e sem HL60: Valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B4, C2135 e W135 ATCC.

Figura 19. Avaliação da expressão de quimiocinas em células Hec-1B no ensaio de transwell com e sem HL60: Valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B4, C2135 e W135 ATCC.

## Índice

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.      | Introdução  | 1  |
| 1.1     | Caracterização Bioquímica e Classificação de <i>Neisseria meningitidis</i>                        | 2  |
| 1.2     | Epidemiologia e patogenicidade de <i>Neisseria meningitidis</i>                                   | 4  |
| 1.3     | Modelos de Estudo   | 10 |
| 2.      | Objetivos   | 16 |
| 3.      | Materiais e Métodos   | 18 |
| 3.1     | Meios de Cultura  | 19 |
| 3.1.1   | Infusão de cérebro-coração (BHI) e BHI Ágar   | 19 |
| 3.1.2   | Ágar Chocolate  | 19 |
| 3.1.3   | Meio GC   | 19 |
| 3.2     | Métodos   | 20 |
| 3.2.1   | Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento  | 20 |
| 3.2.2   | Cultivo Celular   | 22 |
| 2.3     | Ensaio de Adesão  | 23 |
| 3.2.4   | Caracterização do percentual de adesão de <i>Neisseria meningitidis</i> em monoculturas celulares | 24 |
| 3.2.5   | Análise morfológica de culturas celulares após infecção com <i>N. meningitidis</i>                | 26 |
| 3.2.6   | Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias   | 27 |
| 3.2.6.1 | Extração de RNA   | 27 |
| 3.6.2   | Dosagem de Quimiocinas inflamatórias por PCR em tempo real quantitativo (qRT – PCR).              | 28 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.7 Diferenciação de células HL60  | 29 |
| 3.2.8 Ensaio de culturas celulares combinadas em Transwell   | 30 |
| 4. Resultados e Discussão  | 33 |
| 4.1 Percentual de adesão de <i>N. meningitidis</i> em monoculturas celulares   | 34 |
| 4.2 Análise de alteração morfológica em monoculturas celulares<br>após infecção com <i>Neisseria meningitidis</i>    | 35 |
| 4.3 Morfologia de culturas celulares após infecção com linhagens<br>de <i>Neisseria meningitidis</i>                 | 36 |
| 4.3.1 Morfologia de células HEp-2 após ensaio com <i>N. meningitidis</i>   | 37 |
| 4.3.2 Morfologia de células NCI H460 após ensaio com <i>N. meningitidis</i>  | 41 |
| 4.3.3 Morfologia de células Hec-1B após ensaio com <i>N. Meningitidis</i>  | 44 |
| 4.3.4 Morfologia de células NG97 após ensaio com <i>N. meningitidis</i>  | 47 |
| 4.3.5 Morfologia de co-cultura de células Hec-1B e NG97 em transwell<br>após ensaio com <i>N. Meningitidis</i>       | 52 |
| 4.3.6 Morfologia de co-cultura de células Hec-1B, NG97 e HL60<br>em transwell após ensaio com <i>N. meningitidis</i> | 53 |
| 4.4 Avaliação do perfil de expressão de quimiocinas por qRT-PCR<br>em monoculturas celulares                         | 55 |
| 4.6 Avaliação do perfil de expressão de quimiocinas por qRT-PCR<br>em co-culturas celulares em transwell             | 60 |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 5. Conclusões                 | 64 |
| 6. Referências Bibliográficas | 67 |

# **INTRODUÇÃO**

## **1 Introdução**

### **1.1 Caracterização Bioquímica e Classificação de *Neisseria meningitidis***

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

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

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

(Taha *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2010), as quais são as proteínas mais abundantes na superfície dos meningococos (van der Ley *et al.*, 1991; Massari *et al.*, 2000).

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

Ainda, a classificação através de métodos de tipagem molecular pode ser utilizada para dividir linhagens em grupos conhecidos como complexos clonais. Estes são muito utilizados para classificar linhagens de casos invasivos da doença meningocócica e são definidos como grupos geneticamente similares independentes do tipo capsular apresentado. O padrão genético de tais grupos clonais é determinado através da análise de polimorfismos por técnicas de eletroforese de multilocos enzimáticos (*multilocus enzyme electrophoresis* - MLEE) (Caugant *et al.*, 1987) e sequenciamento de multilocus (*multilocus sequence typing* - MLST) de genes de interesse. O MLEE e MLST determinam respectivamente o *electroforetic type* (ET) e o *sequence type* (ST) (Maiden *et al.*, 1998), que, por sua vez definem um complexo clonal. Por exemplo, um grande complexo clonal comumente associado a epidemias pelo mundo é o complexo clonal ET-37/ST-11, o qual inclui linhagens do sorogrupo B, C e W135 (Caugant *et al.*, 1987). No presente estudo serão utilizadas linhagens de diferentes complexos clonais associados a casos invasivos, principalmente no Brasil, como ST8 e ST153.

## 1.2 Epidemiologia e patogenicidade de *Neisseria meningitidis*

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

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

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

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

superfície de *N. meningitidis* estão intimamente envolvidas não apenas na adesão às barreiras celulares, mas, também no escape do sistema imune.

Uma dessas estruturas é a cápsula, considerada como o maior fator de virulência do meningococo (Lancellotti *et al.*, 2006). Tal estrutura tem como função a inibição da atividade bactericida do complemento humano, retardando a opsonização e fagocitose por células específicas, além de aumentar a sobrevivência de tais bactérias no ambiente. Entretanto, de acordo com Dolan-Livengood *et al.* (2003), a ausência do polissacarídeo capsular pode facilitar a adesão de *N. meningitidis* em células do epitélio respiratório, sendo muito comum a presença de linhagens não-capsuladas em seu reservatório natural, a nasofaringe humana.

A cápsula é composta por derivados do ácido siálico ou ácido N-acetil-neuramínico e está relacionada ao *switch* capsular, um mecanismo pelo qual o meningococo é capaz de escapar da resposta imune a um determinado sorogrupo (Lancellotti *et al.*, 2006).

O processo de *switch* capsular, ou comutação capsular, é um fenômeno no qual uma linhagem adquire a capacidade de expressar outro tipo capsular (Swartley *et al.*, 1997). Isso ocorre devido à transmissão horizontal de material genético entre diferentes sorogrupos, resultando em substituição homóloga do gene *synD* através dos processos de transformação e recombinação. Linhagens do tipo C, por exemplo, através deste processo, podem ser transformadas em linhagens do sorogrupo B. Devido ao fato de *N. meningitidis* ser naturalmente competente ao processo de transformação bacteriana, é frequente a ocorrência de trocas horizontais de DNA entre linhagens (Lancellotti *et al.*, 2006).

Assim, as vacinas baseadas na estrutura capsular foram desenvolvidas contra os sorogrupos A, C, Y e W135. No entanto, não há disponível uma vacina contra o sorogrupo B, responsável por grande parte dos casos de meningite em diversos países (van der Ley *et al.*, 1995). Acredita-se que o polissacarídeo capsular do sorogrupo B seja não-imunogênico devido à presença, na cápsula, da molécula de ácido  $\alpha$ -2,8-N-acetil neuramínico, a qual é imunologicamente muito similar ao ácido siálico humano. Além disso, Read e colaboradores (1996) mostraram que o ácido  $\alpha$ -2,8-N-acetil neuramínico, constituinte da cápsula do sorogrupo B, é capaz de modificar a interação do meningococo com macrófagos humanos. A presença dessa estrutura resulta em uma menor aderência da bactéria em tais células fagocitárias e no retardamento da fusão do lisossomo com o patógeno fagocitado (Read *et al.*, 1996).

Desse modo, outros componentes da superfície bacteriana que também atuam como fatores de virulência têm sido alvos para o desenvolvimento de vacinas (Urwin *et al.*, 2004). Entre tais componentes, encontram-se as porinas (van der Ley *et al.*, 1991; Massari *et al.*, 2000). Tais proteínas atuam como poros na membrana bacteriana e são importantes adjuvantes e estimulantes do sistema imune humano. Acredita-se que as proteínas atuem como adjuvantes por estimularem a expressão de moléculas co-estimulatórias, B7-2, na superfície de linfócitos B. Além disso, as porinas atuam como mitógenos destes linfócitos e interagem sinergicamente com CD40 de modo a induzir a proliferação de células B e secreção de imunoglobulinas (Massari *et al.*, 2000).

Assim como as porinas, a fímbria, ou pili, também é um constituinte da membrana externa do meningococo. Trata-se de uma estrutura protéica que se exterioriza da superfície da célula bacteriana e é formada por subunidades chamadas pilinas (van der Woude *et al.*, 2004). Em *Neisseria spp.*, as pilinas são sintetizadas pelo gene *pilE* e sua expressão também está submetida também à variação de fase (Tonjum *et al.*, 1997).

Além de estar envolvido no processo de adesão, o pili pode apresentar significativa importância em fenômenos de transformação (Dubnau, 1999), já que linhagens desprovidas dessa estrutura perdem a competência natural ao processo em questão (Pron *et al.* 1997).

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

Acredita-se que a interação do meningococo, através do pili, com o receptor celular humano CD46 promove o acesso desta bactéria às meninges. CD46 é um regulador do complemento que interage com diversos micro-organismos, como os do gênero *Neisseria*, e é encontrado em grandes quantidades nas células de origem nervosa que compõem a BHE (Johansson *et al.*, 2003).

Outro componente antigênico do meningococo é o LOS. Estudos sugerem que a ligação e interação do LOS do meningococo com receptores Toll-like (TLR) em macrófagos humanos e em outras células do hospedeiro seja responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas através da ativação do fator de

transcrição NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) (Ingalls et al., 2001; Zughaier *et al.*, 2004). Assim, acredita-se que tal molécula seja o principal responsável pela resposta inflamatória do hospedeiro durante a síndrome séptica (Schneider *et al.*, 1984; Jennings *et al.*, 1999; Zughaier *et al.*, 2004).

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

Além dos elementos antigênicos bacterianos e da capacidade de modular a expressão dos mesmos através do fenômeno de variação de fase, *N. meningitidis* apresenta outros mecanismos que permitem sua sobrevivência no ambiente hostil do hospedeiro. A resistência a antibióticos como cloranfenicol e espectinomicina tem sido observada (Galimand *et al.*, 2000). Antignac e colaboradores (2000), correlacionaram o aumento da resistência meningocócica à penicilina G a alterações no gene *penA* que codifica a proteína PBP2, proteína envolvida na síntese da parede celular bacteriana e na qual a penicilina é capaz de se ligar. Ainda, essa diminuição da sensibilidade à penicilina G é transferível pelo processo transformação de uma cepa resistente para outra sensível (Antignac et al., 2000). Mecanismos de escape do sistema imunológico humano também foram relatados. A enzima superóxido-dismutase, por exemplo, protege o meningococo da ação fagocitária de monócitos e macrófagos (Dunn *et al.*, 2003).

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

Além de TNF- $\alpha$ , durante a infecção meningocócica há uma significativa expressão de interferon gamma (INF- $\gamma$ ) (Kornelisse et al., 1997), das interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 e de quimiocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e IL-12 (van Deuren et al., 2000; Robinson et al., 2002). A liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 promove o relaxamento das junções oclusivas que constituem a BHE, levando a uma maior permeabilidade dessa barreira (Schubert-Unkmeir et al., 2010).

### 1.3 Modelos de estudo

Culturas celulares também têm se revelado um modelo viável e comum para o estudo e acompanhamento *in vitro* da interação entre *N. meningitidis* e células humanas, incluindo adesão, invasão, morte celular e resposta imunológica, como liberação de citocinas (Read *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Taha *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2003). No presente trabalho foram utilizadas cinco tipos celulares humanos, HEp-2, NCI H460, Hec-1b, NG97 e HL60, os quais serão brevemente descritos a seguir.

Diversos tipos celulares são utilizados em estudos com *N. meningitidis*. A linhagem HEp-2, por exemplo, é constituída por células derivadas de um carcinoma de laringe humano (Moore *et al.*, 1955). Tais células apresentam crescimento aderente e são amplamente utilizadas em estudos com patógenos respiratório como vírus influenza e *N. meningitidis* (Ahmer *et al.*, 1999).

Outro tipo celular comumente utilizado em estudos com *N. meningitidis* é Hec-1B. Trata-se também de células de origem humana com crescimento aderente, derivadas de adenocarcinoma de endométrio uterino. Estudos com esse tipo celular e bactérias do gênero *Neisseria* mostraram a importância do pili na interação bacteriana com células hospedeiras (Marceau *et al.*, 1999, Scheuerpflug *et al.*, 1999; Spence *et al.*, 2000, Tobiasson *et al.*, 2001).

Células HL60, por sua vez, fazem parte de uma linhagem promielocítica derivada de um paciente com leucemia promielocítica aguda. São células que apresentam receptores para proteínas do complemento e atividade fagocitária e, ainda, são capazes de responder a estímulos quimiotáticos. Sabe-se que células HL60 são capazes de fagocitar de maneira eficaz diferentes linhagens de *N. meningitidis* (Findlow *et al.*, 2006).

Além desses três tipos celulares, o presente estudo também envolve as linhagens NCI H460 e NG97. É importante ressaltar que ambas as linhagens são de células de crescimento aderente e de origem humana e são inéditas como modelo para o estudo de *N. meningitidis*. A linhagem NCI H460 trata-se de um carcinoma de origem epitelial pulmonar classificado como *non-small cell lung cancer* (NSCLC) (Ferreira *et al.* 2000).

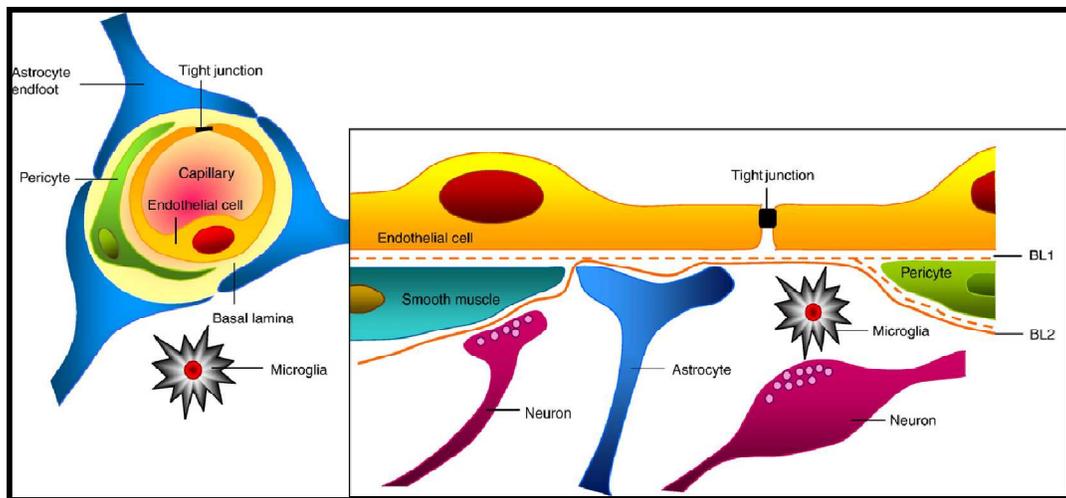
NG97, por sua vez, é uma linhagem constituída por uma população de células heterogêneas, com células pequenas arredondadas, células de formato fusiforme e células morfológicamente semelhantes a células dendríticas (Machado *et al.*, 2005). Entretanto, como se trata de células que apresentam, em sua maioria, marcadores GFAP e S100, um marcador de astrócitos e uma proteína marcadora de células originárias da crista neural (Machado *et al.*, 2005), é provável que células NG97 apresentem características comuns as demais células de origem nervosa.

Devido ao fato do meningococo infectar exclusivamente a espécie humana, estudos *in vivo* acerca de sua patogenicidade e desenvolvimento de vacinas tornam-se restritos. Murinos previamente infectados com vírus da gripe e transgênicos humanizados são uma opção para o estudo com *N. meningitidis* em animais (Kyungcheo *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2003; Johansson *et al.*, 2003; Zarantonelli *et al.*, 2007). Murinos, geneticamente modificados, capazes de expressar o receptor humano CD46 (Johansson *et al.*, 2003) mostraram-se como ferramentas úteis para o estudo dos mecanismos de virulência dessa bactéria. Porém, tais modelos apresentam falhas, o modelo transgênico de CD46 não é capaz de reproduzir completamente a doença, já que a bactéria não adere às células do animal (Mairey *et al.*, 2006).

Pouco se conhece sobre como o meningococo interage com e invade a BHE (Mairey *et al.*, 2006). Logo, sistemas capazes de mimetizar a infecção meningocócica

nessa estrutura são inestimáveis para o entendimento do tropismo característico dessa bactéria pelo cérebro.

A BHE é uma barreira celular entre a circulação sistêmica e o sistema nervoso central, responsável pela homeostase iônica do microambiente do sistema nervoso central (SNC). É uma estrutura complexa constituída por células endoteliais intimamente interconectadas entre si, envoltas por pericitos e prolongamentos de um tipo de célula da glia, os astrócitos (figura 1) (Petty et al, 2002; Haseloff et al, 2005).



**Figura 1. Associações celulares que compõem a Barreira Hematoencefálica.** As células endoteliais adjacentes apresentam junções oclusivas que bloqueiam o transporte paracelular de solutos entre as células. Pericitos relacionam-se com o endotélio de forma descontínua, cercandoo. Estes dois tipos celulares são separados dos demais integrantes da BHE por uma membrana basal (BL1), a qual estabelece uma matriz extracelular que difere em sua composição da matriz dos prolongamentos (*endfeets*) dos astrócitos (BL2). Tais prolongamentos formam uma rede complexa que envolve o endotélio que é importante para a formação e manutenção das propriedades da BHE. Projeções de axônios de neurônios comunicam-se com células associadas ao endotélio, mediando a permeabilidade da barreira. Células da microglia, outro tipo de célula da glia além dos astrócitos, são células imunocompetentes do cérebro. Fonte: Abbott et al, 2010.

As células endoteliais que compõem a BHE são caracterizadas por não serem fenestradas e apresentar raras vesículas de pinocitose (Haseloff et al, 2005). A passagem

de moléculas por tais células pode ocorrer de duas maneiras: através das células por transporte transcelular ou entre as células adjacentes por transporte paracelular (Petty et al, 2002; Haseloff et al, 2005). A via transcelular envolve uma grande variedade de sistemas de transporte de moléculas tanto em sua superfície laminal quanto basal presente nestas células (Haseloff et al, 2005).

A via paracelular, por sua vez, não está associada a tais mecanismos, os solutos são difundidos no espaço entre as células. Contudo, o espaço paracelular entre as células endoteliais da BHE é praticamente obstruído por junções celulares as quais formam uma barreira estrutural que limita a difusão de solutos para o SNC (Petty et al, 2002).

As junções celulares entre células endoteliais adjacentes podem ser de dois tipos: junções aderentes e oclusivas (Ballabh et al., 2004). Nas junções aderentes, proteínas caderinas se ligam ao esqueleto de actina das células endoteliais por meio de proteínas intermediárias, as cateninas (Petty et al, 2002; Ballabh et al., 2004) Essa interação mantém as células adjacentes interligadas e é essencial para a formação das junções oclusivas (Abbott et al, 2010).

As junções oclusivas da BHE consistem num sistema mais complexo de proteínas transmembranas, as claudinas e as proteínas JAM (*Junctional adhesion molecule*), e citoplasmáticas, dentre as quais se destacam a ocludina. Tais proteínas formam um sistema interligado que interage com o esqueleto de actina da célula (Ballabh et al, 2004; Abbott et al, 2010). Por ser a principal causa da obstrução da via paracelular de transporte de solutos, esse tipo de junção é responsável pela principal função da BHE: o controle da permeabilidade do SNC (Engelhardt et al. 2009; Abbott et al, 2010).

Ainda, é interessante ressaltar que tanto o transporte de moléculas para o SNC quanto do SNC para a circulação sistêmica é controlada por propriedades das células

endoteliais. Na BHE, o principal sistema de efluxo é a glicoproteína-P, uma proteína expressa em células endoteliais microvasculares do cérebro, a qual atua como uma bomba de efluxo dependente de ATP (Scherrmann, 2002, Engelhardt et al. 2009).

Enquanto as células endoteliais constituem a barreira física de fato, interações que envolvem outros tipos celulares são importantes para uma BHE funcional. Acredita-se que os astrócitos, ou astrogliia, são responsáveis pela indução e manutenção das propriedades dessa estrutura. O fato de o meio condicionado por este tipo celular induz a formação de junções entre células endoteliais *in vitro* sugere a participação de um ou mais fatores solúveis derivados da glia no desenvolvimento da BHE (Ballabh et al, 2004; Haseloff et al, 2005). Ainda, de acordo com o estudo publicado por Janzer e Raff (1987), astrócitos, células da neuróglia, são capazes de induzir propriedades de BHE em células endotelial não-cerebrais.

O primeiro modelo *in vitro* da BHE foi desenvolvido em 1973 por Joó e Karnushina através do isolamento de microvasos cerebrais e, desde então, diferentes sistemas têm sido desenvolvidos e estudados a fim possibilitar a compreensão de sua fisiologia, farmacologia e patologia (Duport et al., 1998; Weksler et al., 2005; Nakagawa et al., 2007 e 2009; Malina et al., 2009; Sano et al., 2010).

Como células endoteliais e da astrogliia são cruciais para o desenvolvimento e manutenção das propriedades características da BHE, modelos *in vitro* com células endoteliais crescidas em meio condicionado por astrócitos ou co-cultura de células endoteliais e astrócitos (Rubin et al., 1991; Terasaki et al., 2003) bem como outras células da glia foram estudados. No entanto, na maioria desses sistemas, as células da neuroglia eram de origem não-humana, geralmente murina (Terasaki et al., 2003; Nakagawa et al., 2007), e, como *N. meningitidis* é um patógeno exclusivo do homem,

para se estudar mecanismos de patogenicidade dessa bactéria seriam mais adequados e interessantes sistemas com células humanas.

Além disso, a maioria dos modelos *in vitro* de BHE estabelecidos até então apresentam células, derivadas de culturas primárias, imortalizadas utilizando-se genes tumorais, originários, por exemplo, de simian vírus (Muruganandam et al., 1997), papiloma vírus (Kusch-Poddar et al., 2005), lentivírus (Weksler et al., 2005) e retrovírus (Sano et al., 2010).

## **OBJETIVOS**

## **2. Objetivos**

Considerando-se a limitação em relação a modelos disponíveis para o estudo de características da interação de *N. meningitidis* com a BHE, este trabalho teve como uma de suas propostas principais o desenvolvimento de um modelo *in vitro* de BHE com células com características de astrócitos, NG97, e endoteliais, Hec-1b. Como células fagocitárias atuam de maneira crucial no processo de infecção meningocócica, no presente estudo foram utilizados sistemas de BHE *in vitro* com e sem células HL60, a fim de tentar estabelecer condições que permitam a simulação do processo infeccioso por tal patógeno. Assim, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a adesão/invasão por parte de linhagens de *N. meningitidis* em diferentes linhagens de células humanas cultivadas individualmente *in vitro*.
- Desenvolver e estabelecer um sistema *in vitro* com células humanas de origem nervosa e células com características endoteliais, a fim de se criar um modelo celular inédito com condições mimetizando a organização morfofuncional da BHE para o estudo *in vitro* das condições fisiopatológicas da infecção por *N. meningitidis*.
- Analisar a resposta imunológica e alteração celular após a infecção por *N. meningitidis* em cada célula cultivada isoladamente e no modelo de BHE desenvolvido *in vitro*.
- Analisar se a presença de células com capacidade fagocitária influenciam nos parâmetros avaliados no modelo de BHE, como resposta imunológica, alteração celular e passagem de patógenos pela barreira celular.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Meios de Cultura**

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

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

##### **3.1.2 Ágar Chocolate**

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

##### **3.1.3 Meio GC**

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

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

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

### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1 Linhagens Bacterianas e Condições de Crescimento**

Todas as linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas no presente trabalho e suas origens estão descritas na tabela 1. As linhagens foram cultivadas utilizando-se a técnica de esgotamento em ágar chocolate à 37 °C por um período de 18-24 horas. Para o cultivo dos meningococos, utilizou-se também, sob as mesmas condições, o meio GC. Para sua manutenção, as amostras foram suspensas em meio infusão de cérebro-coração (BHI) ao qual foi adicionado glicerol a 30 % e mantidas a -80 °C.

**Tabela 1. Linhagens de *Neisseria meningitidis* utilizadas neste trabalho**

| <b>Linhagem</b>                        | <b>Características</b>   | <b>Origem</b> |
|--|--|---------------|
| <i>N. meningitidis</i> C2135           | Sorogrupo C, BIOMERIEUX C2135  | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> B               | Sorogrupo B, ATCC 23247  | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> W135atcc        | Sorogrupo W135, ATCC 35559   | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> P374            | Sorogrupo Y, líquido, Campo Grande - RJ, Brasil                        | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> B4              | Sorogrupo B4:P1-7,16   | IAL           |
| <i>N. meningitidis</i> B-epidêmica     | <i>N. meningitidis</i> epidêmica                                       | IAL           |
| <i>N. meningitidis</i> P2181           | Sorogrupo C:NT: P1.5-1,10 Cluster A4, ST8, líquido                     | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> P2143           | Sorogrupo C:NT: P1.18-1,3 Cluster A4, ST8, líquido                     | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> P2354           | Sorogrupo B: NT:P1.7-2,3 Cluster A4, líquido, SC, Brasil               | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> P2498           | Sorogrupo C:NT:P1.5-2,10 Cluster A4, ST153, líquido, RJ, Brasil        | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> P2200           | Sorogrupo C:NT: P1.5-2,10 Cluster A4, ST153, líquido                   | INCQS         |
| <i>N. meningitidis</i> W135 Marseille  | Sorogrupo W135 da coleção do Instituto Adolfo Lutz                     | IAL           |
| <i>N. meningitidis</i> W135 referência | Sorogrupo W135 da coleção do Instituto Adolfo Lutz                     | IAL           |
| <i>N. meningitidis</i> Y USA           | <i>N. meningitidis</i> isolada em surtos epidêmicos nos Estados Unidos | IAL           |
| <i>N. meningitidis</i> IAL 2443        | Sorogrupo B:4,7:P1-15,19, <i>N. meningitidis</i> endêmica do Brasil    | IAL           |
| <i>N. lactamica</i>                    |  | IAL           |

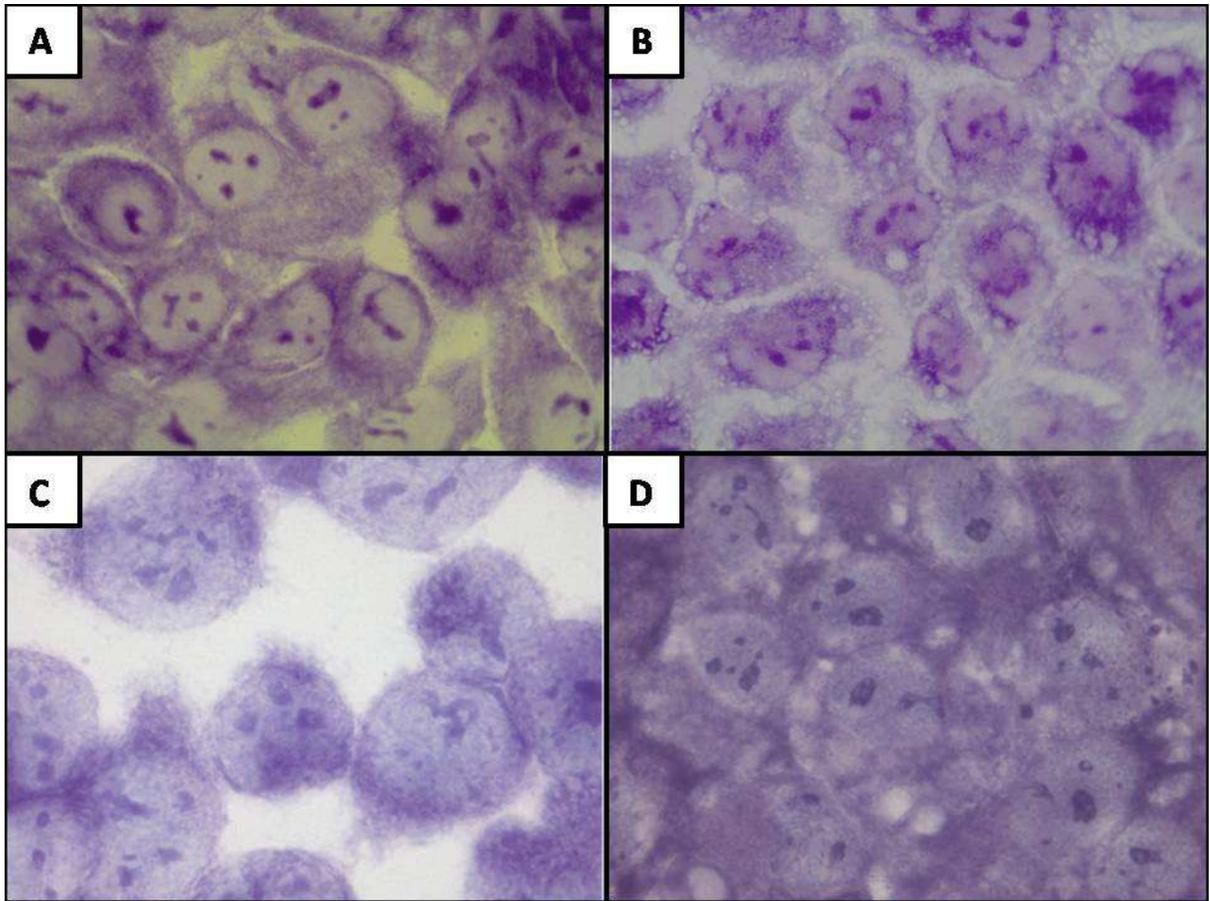
---

IAL – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

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

### 3.2.2 Cultivo Celular

Células HEp-2 (carcinoma epitelial de laringe, obtido do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ), células NCI H460 (carcinoma epitelial pulmonar, obtido da coleção de linhagens do Instituto Adolfo Lutz), células Hec-1b (carcinoma endotelial de uma endometriose humana, obtido da coleção de linhagens celulares do Instituto Adolfo Lutz) e células NG97 (neuroglioblastoma humano, obtido do laboratório da Profa. Dra. Liana Verinaud – Depto de Imunologia – IB - UNICAMP) (representadas na figura 2) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab Ltda., Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10-20 % de Soro Fetal Bovino (SFB), dependendo da linhagem celular, e mantidas à 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a confluência da monocamada celular, as células foram tripsinizadas e distribuídas em placas de 24 orifícios. A concentração celular obtida após a tripsinização era de 1.10<sup>6</sup> células/mL. Cada *well* recebeu uma alíquota de 1 mL da suspensão celular. As placas em questão foram incubadas sob as mesmas condições supracitadas até a confluência da monocamada celular.



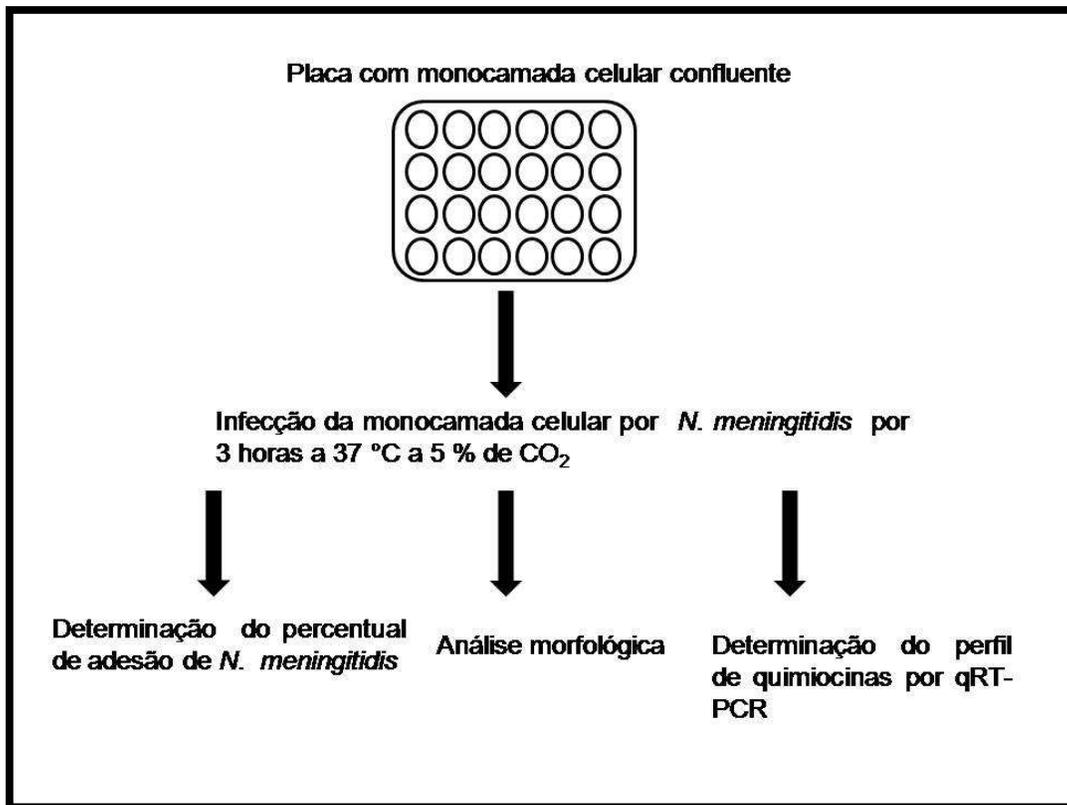
**Figura 2.** Micrografias das linhagens utilizadas no trabalho. Células HEp-2 (A), NCI H460 (B), Hec-1B (C) e NG97 (D). Aumento de 1000 X.

### 3.2.3 Ensaio de Adesão

O teste de adesão em células foi baseado na metodologia descrita por Scaletsky et al. (1984). Para a realização do mesmo, 50  $\mu$ L de uma suspensão bacteriana contendo  $1.10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC) foi adicionada a cada poço contendo 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB. Para determinar a quantidade de UFC de *N. meningitidis* utilizadas em cada teste de adesão, um volume também de 50  $\mu$ L foi plaqueado em placas de ágar chocolate e incubadas a 37 °C por 16-18 horas.

A placa teste de células e bactérias foi incubada a 37 °C por 3 horas e esta foi encaminhada a três análises diferentes: percentual de adesão, análise morfológica e

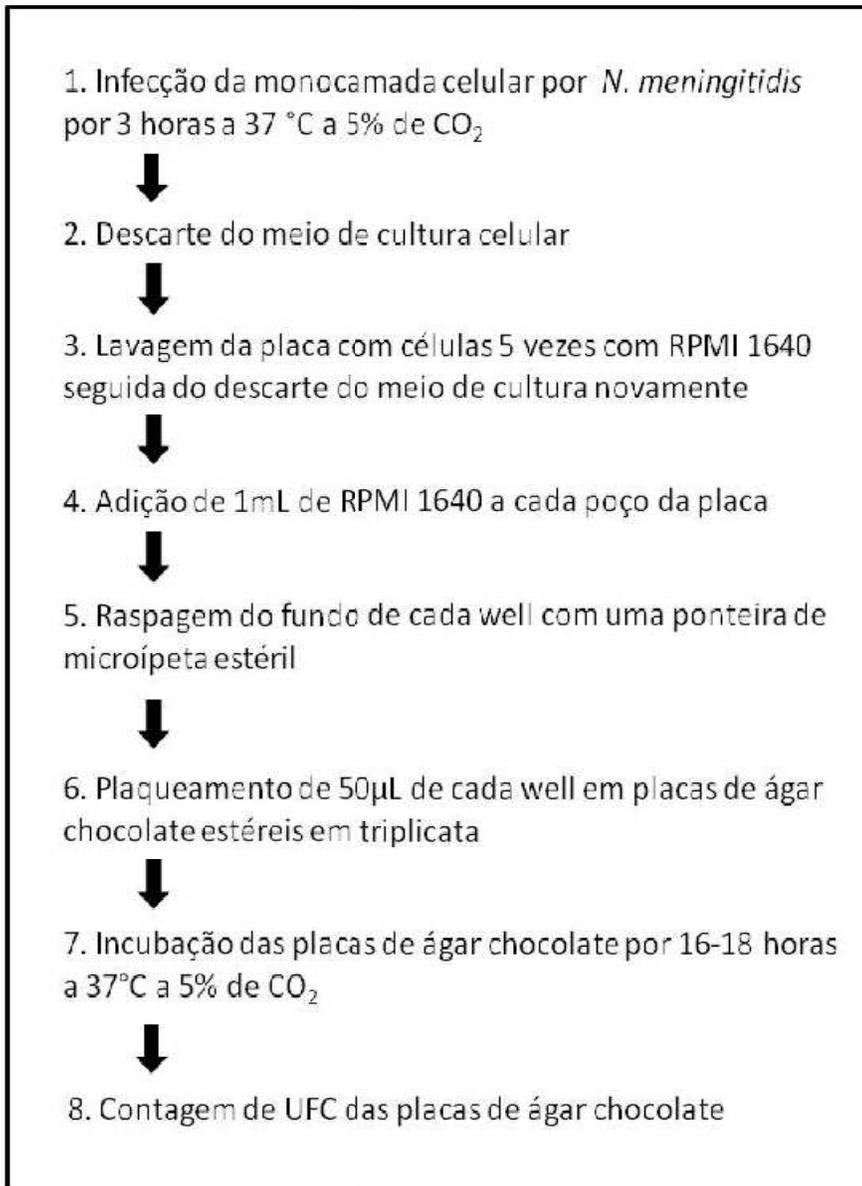
perfil de expressão de quimiocinas inflamatórias. A metodologia utilizada para tais análises estão descritas nos tópicos seguintes.



**Figura 3.** Esquema representativo da metodologia em comum para a obtenção do percentual de adesão de *N. meningitidis*, análise de alteração morfológica e determinação do perfil de expressão de quimiocinas inflamatórias em células submetidas à infecção por esse patógeno.

### 3.2.4 Caracterização do percentual de adesão de *Neisseria meningitidis* em monoculturas celulares

O percentual de adesão de diferentes linhagens de meningococo na linhagens celulares HEp-2, NCI H460, Hec-1B e NG97 foi obtido através da metodologia ilustrada na figura 3.



**Figura 4.** Metodologia utilizada para obtenção do percentual de adesão de *N. meningitidis* em culturas celulares.

É interessante ressaltar que a lavagem da placa contendo a cultura celular após o período de infecção (etapa 3 – figura 4) foi realizada a fim de eliminar as bactérias que não aderiram nas células.

Após a obtenção do número de UFC de cada placa de ágar chocolate, calculou-se o percentual de adesão de cada linhagem meningocócica para cada tipo de célula

estudada. Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico no software Prisma através do teste de Tukey.

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

A análise morfológica de células HEP-2, NCI H460, Hec-1B e NG97 foi realizada através de lâminas de microscopia óptica. Para isso, lamínulas estéreis foram colocadas no fundo de wells de placas de 24 poços, nas quais as células cultivadas nessas placas formaram camadas confluentes nas lamínulas.

Após o processo de infecção por *N. meningitidis*, descrito no tópico Ensaio de Adesão (tópico 3.2.3), o meio de cultura celular foi descartado e as placas foram lavadas 5 vezes com RPMI 160 estéril. A seguir, as lamínulas foram submetidas à coloração de eosina-azul de metileno segundo Wright (Solução de Corante de Wright – Nalgon, Itupeva, São Paulo, Brasil) e montadas sobre lâmina óptica com Entellan®/MERCK. Tal procedimento permitiu a visualização em microscopia óptica das alterações e da adesão do meningococo nas células *in vitro*.

A partir das lâminas obtidas através do ensaio de adesão, foi possível a visualização das alterações e da adesão do meningococo às células *in vitro* em microscopia óptica. Para determinar se houve alteração morfológica significativa nas células submetidas à infecção, observou-se as lâminas em microscopia de luz com objetiva de 100 X e foi realizado o seguinte procedimento: a cada 100 células, contou-se aquelas que apresentaram alteração morfológica em relação aos controles negativos. Os campos de visualização para contagem de células foram escolhidos de maneira aleatória.

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

### **3.2.6 Análise da expressão de quimiocinas inflamatórias**

#### **3.2.6.1 Extração de RNA**

Células cultivadas em placas de 24 wells foram submetidas ao processo de infecção por *N. meningitidis* descrito no tópico de Ensaio de adesão. Após um período de 3 horas, o meio de cada *well* foi retirado. A cada orifício, foi adicionada a alíquota de 300  $\mu$ L de Trizol Reagent® (Invitrogen Inc. Carlsbad, CA, USA) e com o auxílio de uma ponteira de micropipeta estéril, o conteúdo total de extração de cada *well* foi retirado e transferido para um eppendorf de 1,5 mL RNase free.

Cada amostra recebeu um volume de 200  $\mu$ L de clorofórmio, agitada e incubada 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras, então, foram centrifugadas a 10000 rpm a 4 °C por 15 minutos. Após a centrifugação, houve a formação de 3 fases em cada eppendorf: uma fase superior aquosa com RNA, uma interface e outra orgânica, ambas com DNA e proteínas. A fase que continha RNA foi transferida para um novo eppendorf RNase free. Adicionou-se uma alíquota de 500  $\mu$ L de isopropanol a cada tubo e estes foram incubados a -20 °C por 30 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm a 4 °C por 10 minutos e, posteriormente, os sedimentos foram lavados com 500  $\mu$ L de etanol 70 %. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000 rpm em um período de 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após a evaporação do álcool, os pellets foram ressuspensos em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato 0,01 % v/v) e conservado à -80 °C.

### 3.2.6.2 Dosagem de Quimiocinas inflamatórias por PCR em tempo real quantitativo (qRT – PCR).

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

**Tabela 2. Lista de Oligonucleotídeos utilizados para qRT-PCR**

| Quimiocina    | Oligonucleotídeo   | Tamanho do produto (pb) |
|---------------|--|-------------------------|
| IL6           | FW GAGGATACCACTCCCAACAGACC<br>RV AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA     | 141                     |
| IL8           | FW ATGACTTCCAAGCTGGCC GTGGCT<br>RV TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAA | 294                     |
| IL10          | FW GTGATGCCCAAGCTGAGA<br>RV CACGGCCTTGCTCTTGTTT                | 138                     |
| TNF- $\alpha$ | FW TCTTCTCGAACCCCGAGTGA<br>RV CCTCTGATGGCACCACCAG              | 151                     |
| GAPDH         | FW TGCACCACCAACTGCTTAGC<br>RV GGCATGGACTGTGGTCATGAG            | 148                     |

FW – Oligonucleotídeo forward, RV- Oligonucleotídeo Reverse

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

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

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

### 3.2.7 Diferenciação de células HL60

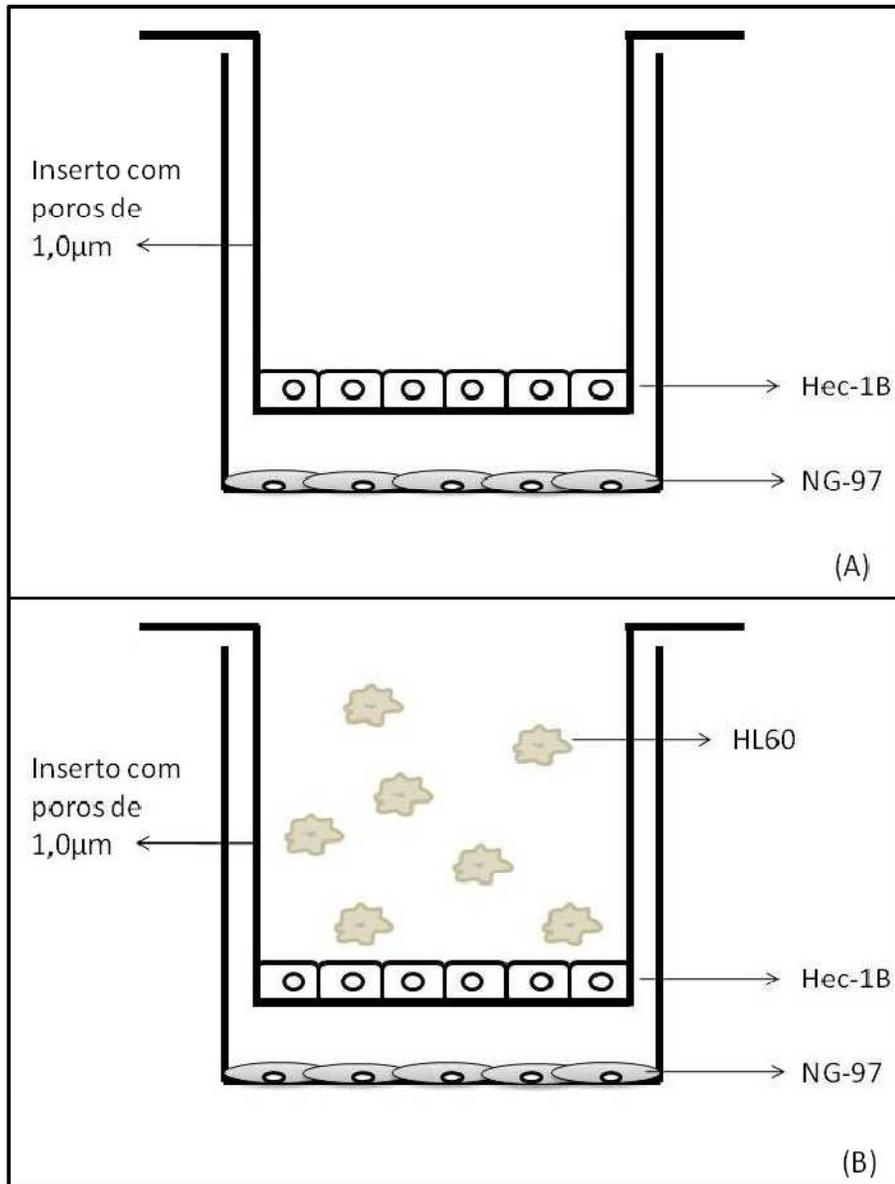
Células HL60 (linhagem pró-mielocítica), obtidas da Coleção de Culturas de Células do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 20 % de SFB a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante o período de 96 horas. A quantidade de células foi monitorada em câmaras de Neubauer.

Quando esta chegou a  $1.10^8$  células/mL, alíquotas maiores de meio de cultura foram adicionadas até que a obtenção de uma suspensão celular com concentração de  $1.10^6$  células/mL.

Uma vez obtida a concentração celular necessária, as células HL60 foram distribuídas em alíquotas de 1 mL em cada um dos 24 orifício de uma placa. Estas células foram submetidas ao processo de diferenciação em linhagem granulocitária através da adição de 1,5 % de dimetil sulfóxido (DMSO) em condições assépticas e da incubação por, no mínimo 5 dias, em condições supra-citadas. As células HL60 diferenciadas foram então destinadas ao ensaio de Transwell, descrito a seguir.

### **3.2.8 Ensaio de culturas celulares combinadas em Transwell**

Culturas de células NG97 e Hec-1B foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB. Após a confluência das monocamadas celulares, ambas as células foram tripsinizadas. As células NG-97 foram transferidas para uma placa de 24 wells, alguns destes com lamínulas estéreis no fundo. Células Hec-1B, por sua vez, foram transferidas para insertos (thin certs – Greiner Bio One) com poros de  $1,0\mu\text{m}$ . Tais insertos ficaram suspensos na placa que continha a cultura de NG-97, conforme está ilustrado na figura 5.



**Figura 5.** Demonstração esquemática de poços de co-cultura de células Hec-1B (origem endotelial) e NG97 (origem nervosa) sem (A) e com (B) células HL60 (origem granulocitária).

Após a confluência de ambos os tapetes celulares, metade da placa de co-cultura recebeu um volume de 50 μL de uma suspensão de células HL60 diferenciadas ( $5 \times 10^3$  células). Antes de serem adicionadas, as células HL60 foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos para se retirar o DMSO do meio.

A placa foi incubada a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> por 4 horas e, após esse período, realizou-se a infecção da mesma. Para tal, adicionou-se uma alíquota de 50 µL de suspensões contendo 1.10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) de *N. meningitidis* C2135, B4 e W135 ATCC em cada inserto de células Hec-1B. Entretanto, para realizar a infecção, cada inserto contendo células Hec-1B foi transferido para uma placa vazia e estéril de 24 wells. Tal procedimento foi adotado para evitar uma possível contaminação acidental na parte inferior da placa, a qual continha células NG-97, no momento de infecção dos insertos. Assim, eliminou-se a possibilidade de um resultado falso positivo em relação à passagem de *N. meningitidis* no modelo de BHE testado.

Após a infecção, os insertos com Hec-1B foram reposicionados à placa com NG-97. A placa, então, foi incubada por 18 horas nas mesmas condições descritas acima.

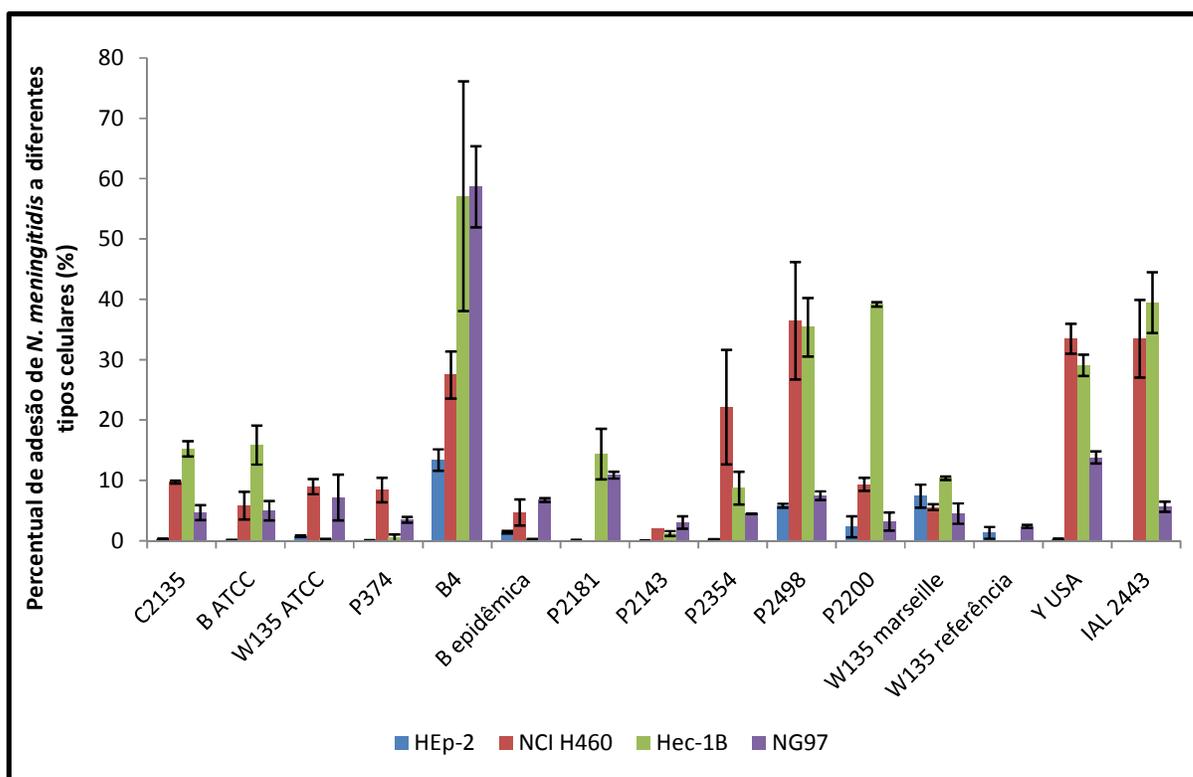
Os poços que não apresentavam lamínulas foram destinados à extração de RNA e quantificação de citocinas inflamatórias (metodologia descrita no item 2.6). As lamínulas foram lavadas 5 vezes com RPMI 1640, submetidas à coloração de eosina-azul de metileno segundo Wright e montadas com Entellan®/MERCK.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Percentual de adesão de *Neisseria meningitidis* em monoculturas celulares

Os dados obtidos nos ensaios para a determinação do percentual de adesão de *N. meningitidis* em células HEp-2, NCI H460, Hec-1B e NG97 foram realizados segundo a metodologia descrita no tópico 3.2.4 (Material e métodos) e estão apresentados no gráfico abaixo.

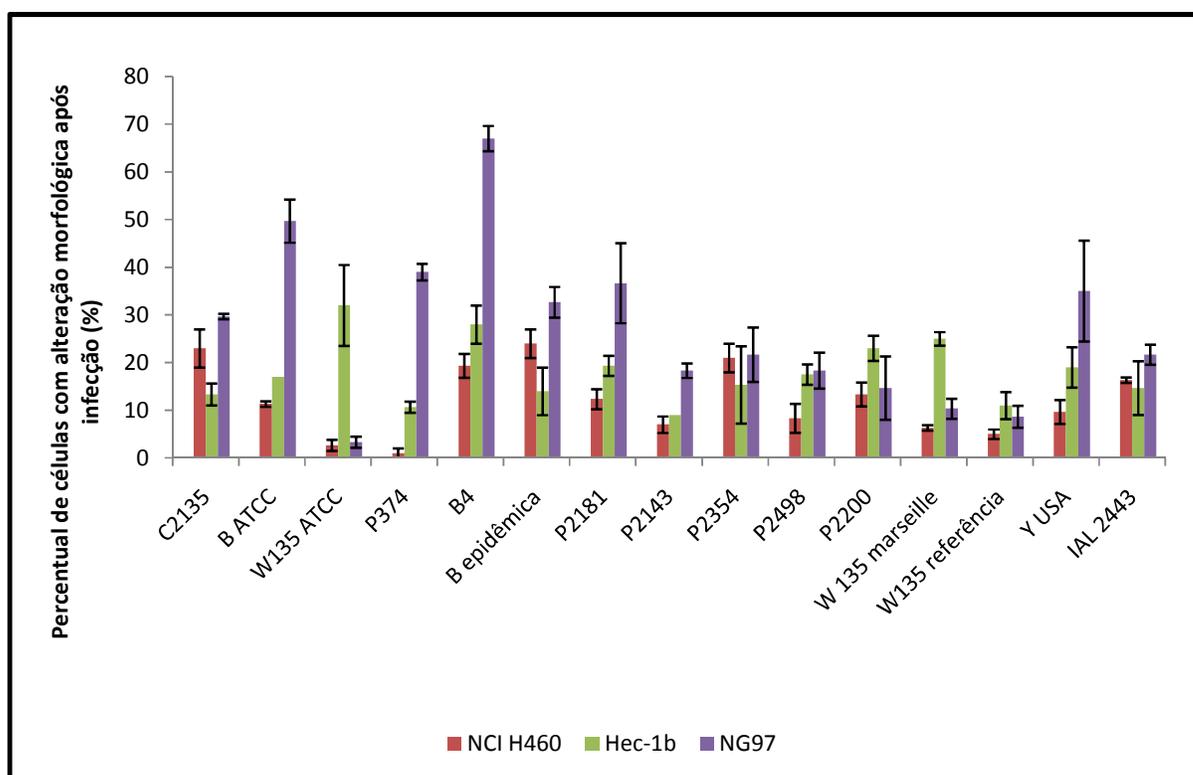


**Figura 6.** Percentual de adesão de diferentes linhagens de *N. meningitidis* em células HEp-2, NCI H460, Hec-1B e NG97. Os experimentos foram realizados em placas de 24 wells em triplicatas e os resultados representam médias e desvio padrão dos dados obtidos.

\*Não foi possível estabelecer valores de adesão das linhagens P2181 e W135 referência em células NCI H460.

## 4.2 Análise de alteração morfológica em monoculturas celulares após infecção com *Neisseria meningitidis*

A análise de alteração morfológica em células HEp-2, NCI H460, Hec-1B e NG97 após a infecção com diferentes linhagens meningocócicas seguiu a metodologia descrita no tópico 3.2.5. Os dados obtidos para as células NCI H460, HEC-1B e NG97 estão representados no gráfico abaixo.



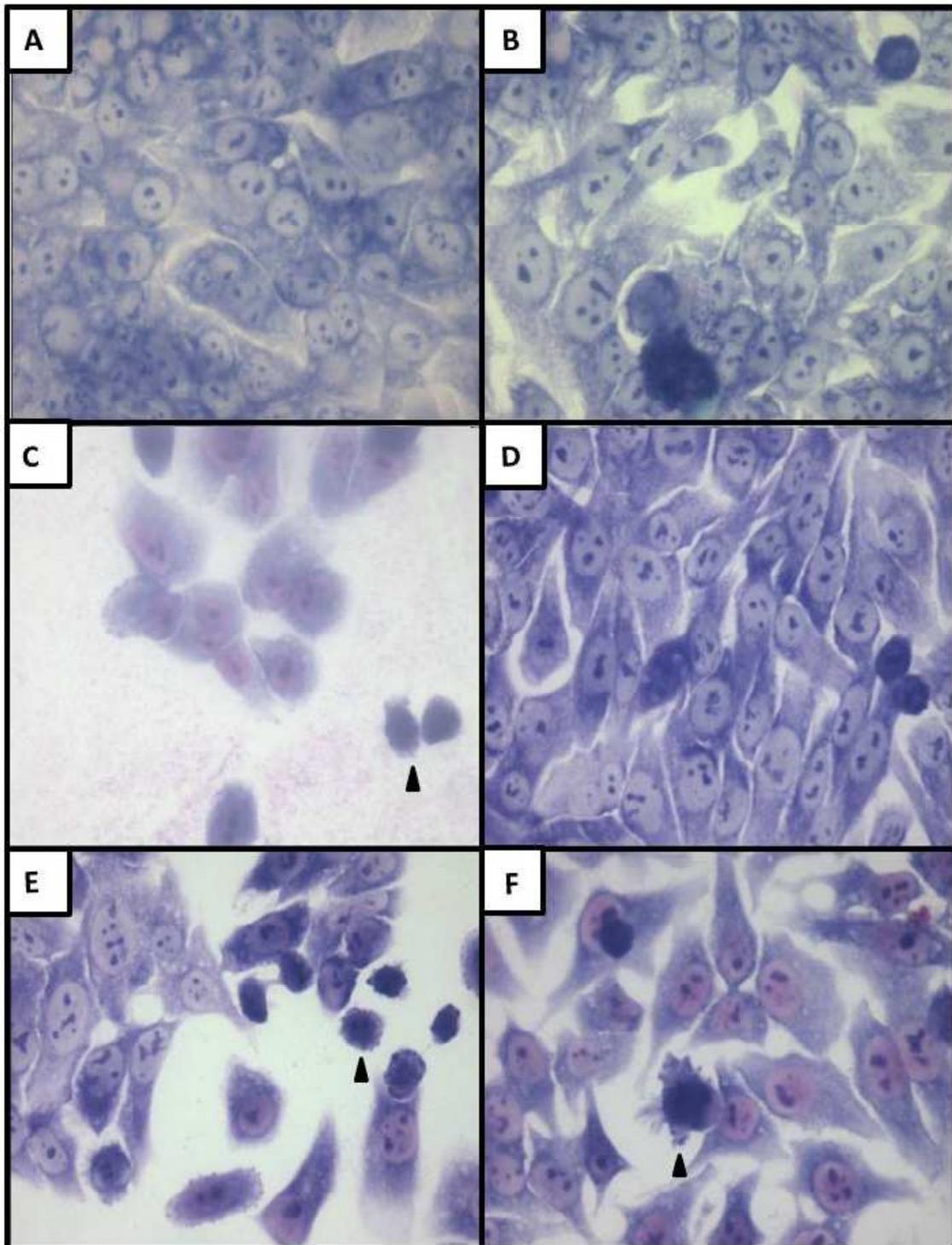
**Figura 7.** Percentual de alteração da morfologia de células NCI H460, Hec-1B e NG97 após infecção com diferentes linhagens de *N. meningitidis*. Os experimentos foram realizados em placas de 24 wells em triplicatas e os resultados representam médias e desvio padrão dos dados obtidos.

\*A contagem de alteração morfológica em células HEp-2 não está representada no gráfico pois tal linhagem celular apresentou valores muito baixos (próximos a zero) para a maioria das linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo.

### **4.3 Morfologia de culturas celulares após infecção com linhagens de *Neisseria meningitidis***

As lâminas de microscopia óptica das células HEp-2, NCI H460, Hec-1B e NG97 cultivadas isoladamente e células NG97 em co-cultura nos ensaios em transwell obtidas segundo a metodologia descrita nos tópicos 3.2.5 e 3.2.6, respectivamente, foram analisadas ao microscópio de luz e estão representadas pelas micrografias a seguir.

As setas indicam meningococos aderidos às células. As pontas de setas evidenciam a ocorrência de alterações na morfologia das células analisadas.

4.3.1 Morfologia de células HEp-2 após ensaio com *N. meningitidis*

**Figura 8.** Células HEp-2 (A), células HEp-2 após ensaio de adesão com *N. meningitidis* C2135 (B), B4 (C), P2181 (D), P2143 (E) e P2498 (F). Aumento de 400 X.

As linhagens de *N. meningitidis* utilizadas neste estudo apresentaram baixo percentual de adesão em células HEp-2, quando comparadas às demais linhagens celulares. O maior percentual aderente neste tipo celular foi da linhagem B4 (13,4 %) seguida das linhagens W135 Marseille (7,41 %) e P2498 (5,84 %). Tais valores apresentaram-se estatisticamente maiores que os demais (Figura 6;  $P < 0,001$ ). Os valores de adesão das outras linhagens foram próximos a zero (Figura 6).

Um número pouco representativo de células apresentou alteração morfológica após o desafio com diferentes linhagens de meningococo. A linhagem B4 foi a única que se destacou pelo fato de ser responsável por mudanças morfológicas detectáveis a microscópio óptico em HEp-2. Apesar de células infectadas com linhagens como C2135 (Figura 8.B) e P2143 (Figura 8.E) apresentarem alterações morfológicas, estas foram pontos de alteração isolados, sendo que a maioria destas não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo (Figura 8.A) ao microscópio de luz.

É interessante ressaltar, entretanto, que as linhagens de *N. meningitidis* B4, W135 Marseille e P2498 obtiveram alto valor de adesão em comparação a *N. lactamica* ( $P < 0,001$ ), outra Neisseriaceae que comumente habita o trato respiratório humano. Esta bactéria apresentou em HEp-2 0,05 % de adesão (dados não apresentados neste trabalho).

Diversos fatores podem estar associados à colonização e interação entre *N. meningitidis* e células do trato respiratório superior (representada nesse trabalho por células HEp-2) e inferior (representado por células NCI H460). A colonização por *N. meningitidis* é afetada também por fatores do próprio hospedeiro como idade e tabagismo. Segundo o estudo feito por Cartwright (1987), crianças, com faixa etária abaixo de cinco anos, apresentam uma taxa de colonização de *Neisseria lactamica* cinco

vezes maior do que de *N. meningitidis*. Acredita-se que a colonização por *N. lactamica* seja importante no desenvolvimento inicial da imunidade contra o meningococo (Cartwright et al., 1987).

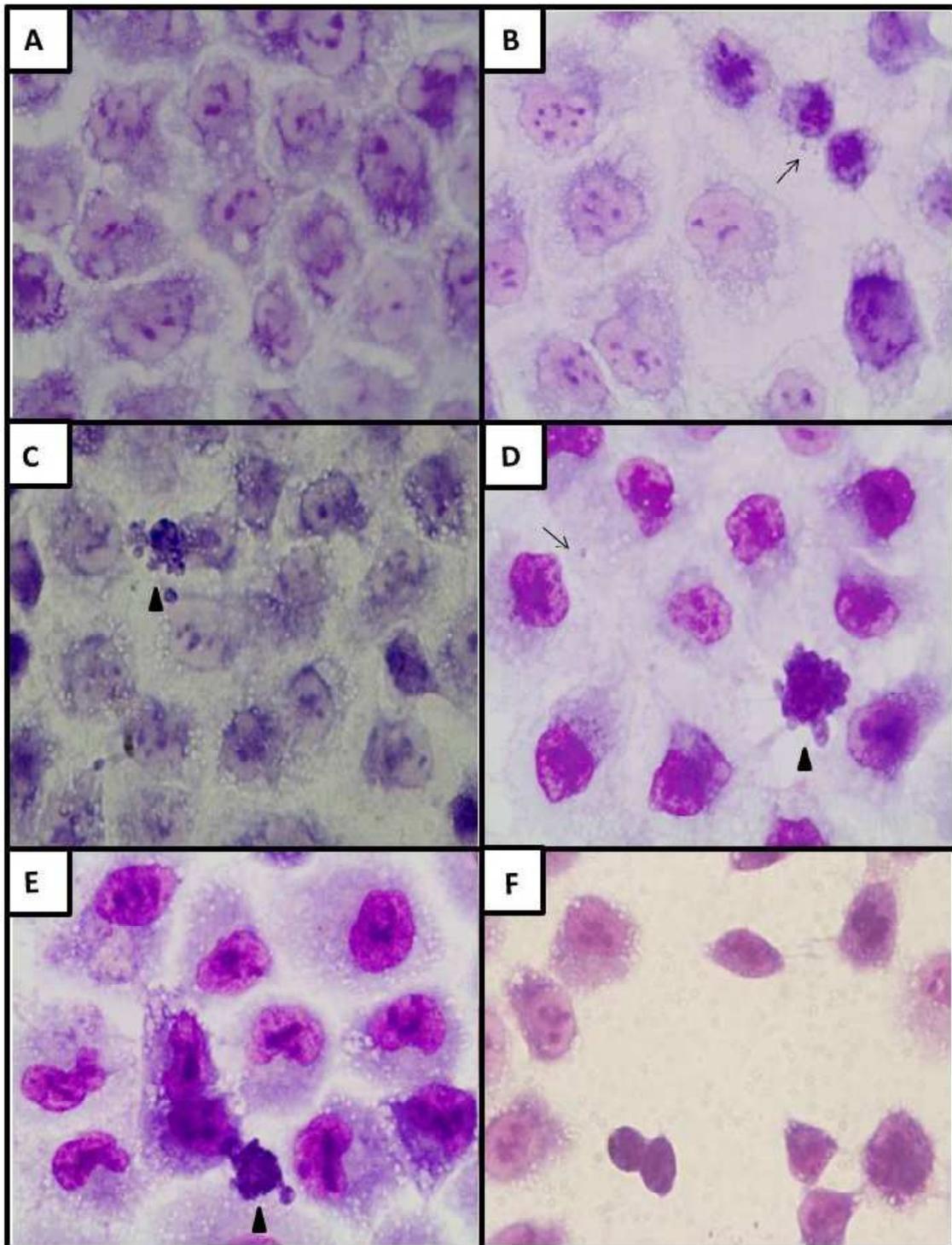
Raza e colaboradores (1993), por exemplo, demonstraram que células HEp-2 infectadas com vírus respiratório sincicial (RSV) são mais susceptíveis à adesão por diversas espécies de bactéria, como *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae* e *N. meningitidis*.

Ainda, sabe-se que existe uma relação entre tabagismo ativo e a colonização do trato respiratório superior por meningococos. Um estudo realizado por Blackwell e colaboradores (1990) com estudantes ingleses demonstrou que há um aumento significativo na proporção de indivíduos colonizados por meningococos entre estudantes fumantes e estudantes não fumantes e/ou fumantes passivos. Sabe-se também que, apesar de não estar relacionado a um aumento na expressão de antígenos celulares que podem atuar como receptores às bactérias patogênicas, o aumento da colonização bacteriana em células epiteliais de indivíduos fumantes pode estar relacionado a alterações em tais células devido a componentes do fumo (Ahmer et al., 1999). Ainda, o fumo passivo apesar de não estar associado a um aumento na taxa de colonização está associado ao desenvolvimento de infecções meningocócicas (Blackwell et al., 1990).

Pouco se conhece acerca de como o meningococo ultrapassa a mucosa epitelial respiratória. Contudo, acredita-se que tal evento esteja relacionado à variação de fase de antígenos meningocócios. Em um primeiro momento, presume-se que a colonização da nasofaringe ocorra através da elevada expressão de tipos específicos de pili e de proteínas de opacidade. Após essa adesão inicial, fatores desconhecidos levariam à perda da expressão da cápsula e talvez até do pili e a expressão de outro tipo de proteína

de opacidade, dando ao meningococo a habilidade de invadir e matar as células da mucosa nasofaríngea (de Vries et al., 1996).

Os dados apresentados no presente estudo com células HEp-2 possivelmente exemplificam a etapa inicial de contato entre *N. meningitidis* e seu hospedeiro. O fato de células HEp-2 não apresentarem alteração morfológica visível ao microscópio óptico pode estar relacionado ao fato de a nasofaringe ser geralmente considerada como um habitat natural e reservatório de *N. meningitidis*, no qual a interação entre bactéria e células hospedeira pode ocorrer de forma comensal e não-invasiva (de Vries *et al.*, 1996).

4.3.2 Morfologia de células NCI H460 após ensaio com *N. meningitidis*

**Figura 9.** Células NCI H460 (A), células NCI H460 após ensaio de adesão com *N. meningitidis* B ATCC (B), B4 (C), P2354 (D), P2143 (E) e Y USA (F). Aumento de 1000 X.

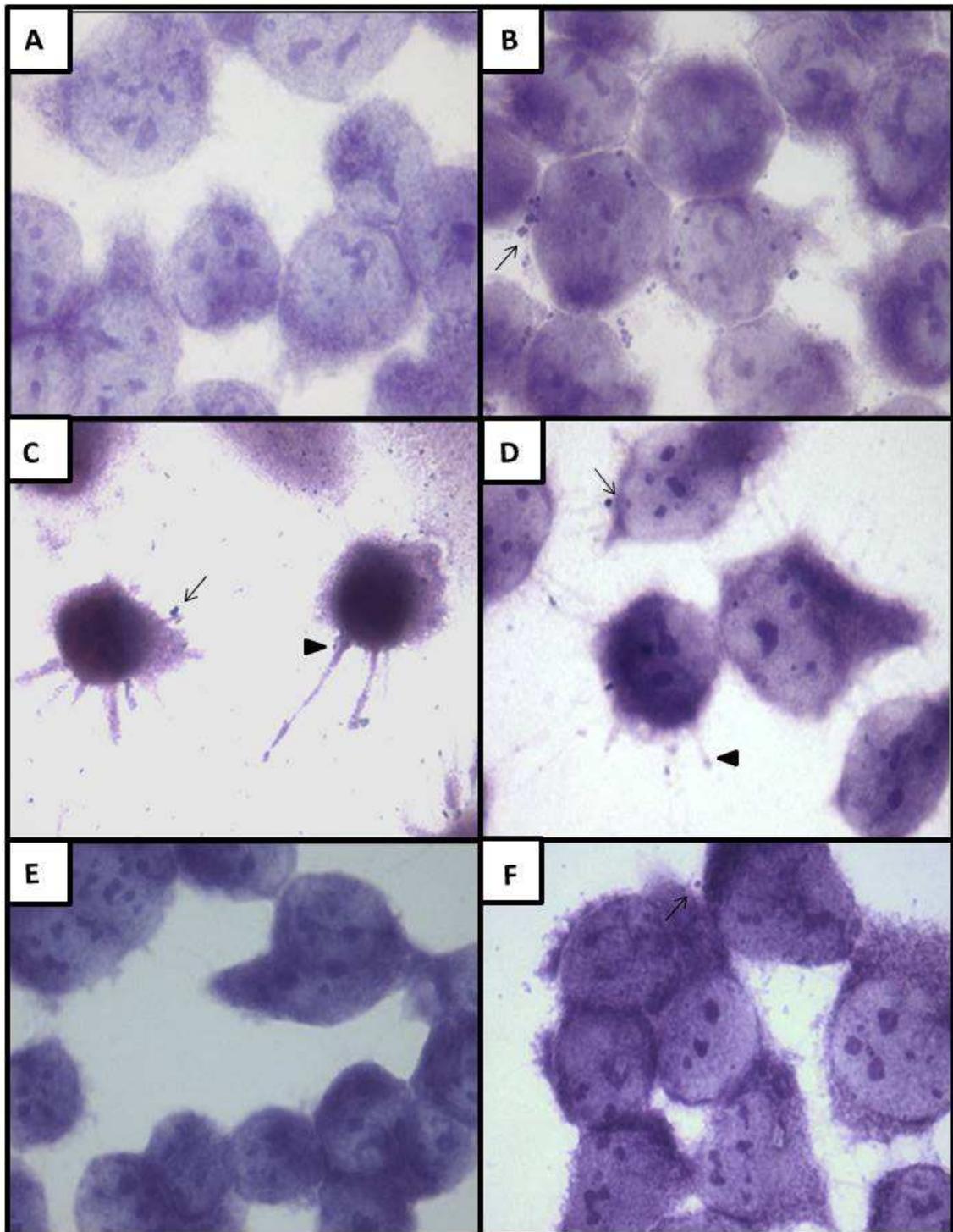
Células NCI H460 mostraram-se mais permissivas à infecção por *N. meningitidis* que apresentou valores de adesão maiores se comparados aos obtidos em HEp-2 (figura 6). Neste tipo celular, quatro linhagens destacaram-se como mais aderentes: P2354 (22,18 %), P2498 (36,48 %), Y USA (33,53 %), IAL 2443 (33,52 %) e B4 (27,5 %). (Figura 6;  $P < 0,05$ ). As demais linhagens de meningococo apresentaram valores percentuais entre 9,77 (C2135) e 2 (P2143) e foram consideradas estatisticamente semelhantes (Figura 6). Entretanto, a linhagem C2135 foi uma das maiores causadoras de alterações na morfologia de NCI H460, cerca de 23 % das células infectadas com essa bactéria apresentaram diferenças, quando comparadas ao controle negativo (Figura 9.A), como citoplasma mais denso e projeções citoplasmáticas. Células NCI H460 infectadas pela linhagem B epidêmica também apresentaram alterações significativas em sua morfologia com 24 % de células com aspecto morfológico diferente em relação ao controle negativo.

Sabe-se que, após a colonização da mucosa da nasofaringe, pode ocorrer a microaspiração do trato respiratório inferior, com o conseqüente desenvolvimento de um quadro raro de infecção meningocócica pulmonar, como pneumonia (Winstead et al., 2000; Alonso, 2008). Estudos indicam que a infecção pulmonar por *N. meningitidis* é característica de linhagens pertencentes ao sorogrupo Y (Winstead et al., 2000). Dentre as 15 linhagens de bactéria utilizadas no presente estudo, duas são do sorogrupo Y, as linhagens P374 e YUSA. Tais linhagens apresentaram comportamentos diferentes. *N. meningitidis* P374 apresentou 8,43 % de adesão (Figura 6) e 1 % de células NCI H460 (Figura 7) com morfologia alterada. A linhagem Y USA apresentou um e um valor de 9,67 % (Figura 7) de células com alterações morfológicas (Figura 9.F), e um dos maiores valores de adesão ao tipo celular em questão, 33,53 % (Figura 6) ( $P < 0,05$ ).

A literatura atual não apresenta estudos anteriores sobre a interação entre o meningococo e células NCI H460, um carcinoma epitelial pulmonar NSCLC (Ferreira *et al.* 2000). Porém, outra célula classificada como NSCLC e, por consequência de origem comum, é A549 (Koll *et al.* 2008). Tal tipo celular expressa altos níveis de CEACAM (Horton *et al.* 2009), os quais como foi discutido anteriormente, atuam como mediadores diretos da relação entre proteínas de opacidade (Opa) do meningococo e células hospedeiras (de Jonge *et al.*, 2003; Callaghan *et al.*, 2006; Horton *et al.* 2009). Estudos de adesão do grupo entre A459 e *N. meningitidis* apresentaram valores muito próximos entre os realizados em células NCI H460 para as mesmas linhagens de meningococo (dados não apresentados).

Dada a semelhança entre células NCI H460 e A459 e o fato de que a expressão de proteínas de opacidade é um passo crucial para a adesão em células epiteliais (Ahmer *et al.*, 1999), é possível que a adesão preferencial em células NCI H60 em relação a HEp-2 esteja relacionada ao provável fato dessa primeira apresentar elevados níveis de CEACAM.

A interação e invasão de células pulmonares por *N. meningitidis* também é mediada por outras estruturas presentes na superfície bacteriana, tais como o LOS. Em estudos *in vivo*, meningococos mutantes desprovidos de LOS, quando comparados a linhagens selvagens, apresentam menor interação com o pulmão de camundongos e são incapazes de atingir à corrente sanguínea e causar meningococemia (Zarantonelli *et al.*, 2006).

4.3.3 Morfologia de células Hec-1B após ensaio com *N. meningitidis*

**Figura 10.** Células Hec-1B (A), células Hec-1B após ensaio de adesão com *N. meningitidis* B ATCC (B), W135 ATCC (C), B4 (D), B epidêmica (E) e P2181 (F). Aumento de 1000 X.

De modo geral, a linhagem celular Hec-1B apresentou mais alterações morfológicas; além das linhagens de bactérias testadas apresentarem valores mais elevados de adesão a esse tipo celular em comparação a células HEp-2 e NCI H460. A linhagem B4 apresentou 57,14 % de adesão (Figura 6) nesse tipo celular, correspondendo à mais alta adesão ( $P < 0,05$ ). Tal linhagem meningocócica apresentou 28 % das células infectadas por essa bactéria apresentaram morfologia alterada (Figura 7), como citoplasma mais denso e formação de “blebs”, expansões citoplasmáticas (Figura 10.D).

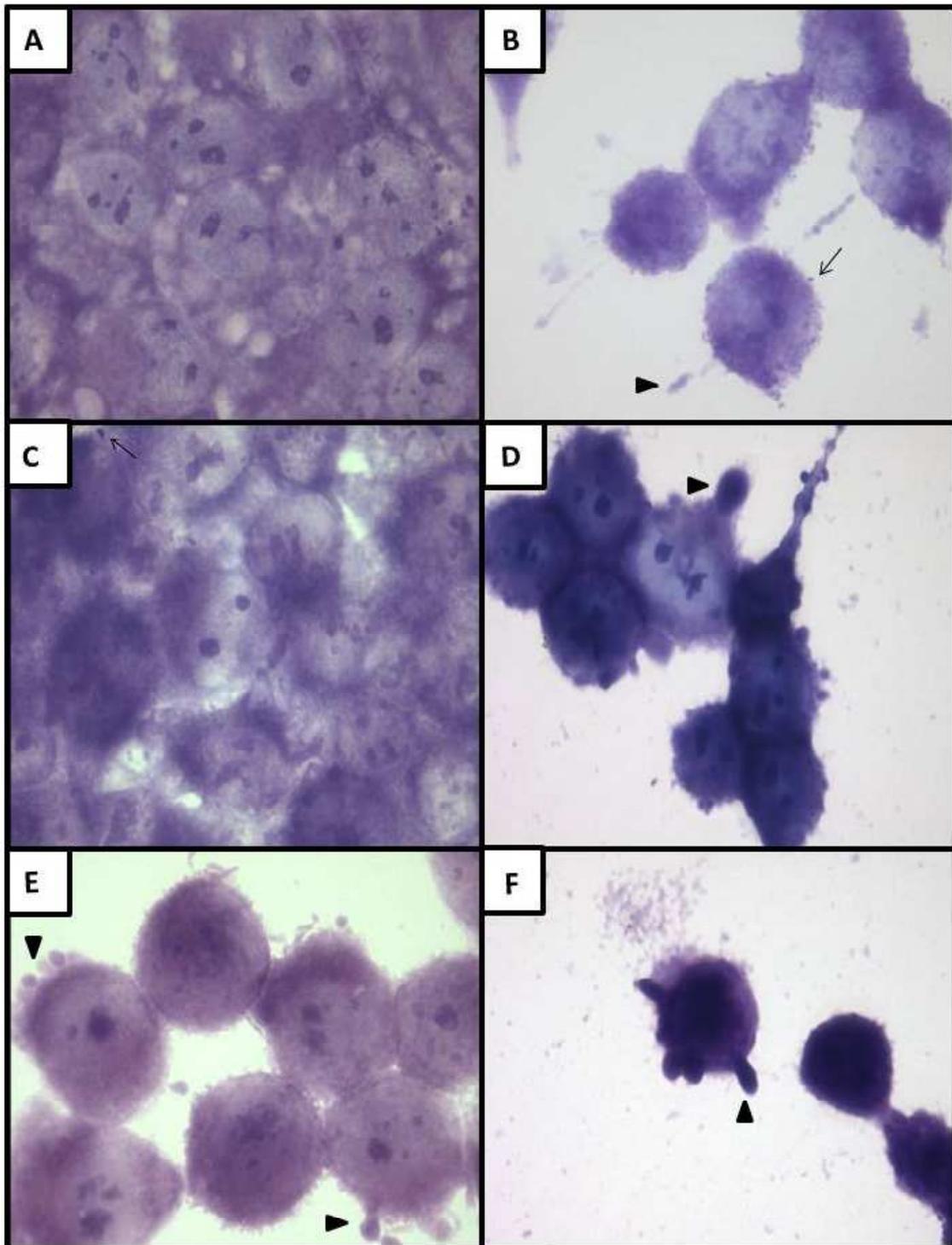
As linhagens P2498, P2200, Y USA e IAL 2443 também apresentaram valores altos de adesão em relação às demais linhagens ( $P < 0,05$ ) com valores de 39,52 a 29,11 % (IAL 2443 e Y USA, Figura 6). Tais linhagens também obtiveram valores de alteração morfológica estatisticamente semelhantes a B4 ( $P < 0,05$ ), variando de 16,33 a 30 % (P2498 e IAL 2443, respectivamente, Figura 7).

Assim, é possível inferir que um número alto de adesão não está diretamente relacionado a uma alta taxa de alterações morfológicas em células Hec-1b.

Na literatura, a linhagem celular Hec-1b é amplamente utilizada como modelo de adesão de bactérias do gênero *Neisseria* (Marceau *et al.*, 1999, Spence *et al.*, 2000, Scheuerpflug *et al.*, 1999, Tobiasson *et al.*, 2001 e Kirchner *et al.*, 2005). Marceau *et al.* (1999) demonstrou que pilinas S do tipo SB isoladas de uma linhagem encapsulada de *N. meningitidis* sorogrupo C (8013) eram responsáveis por alta adesão em células Hec-1b. Pilinas S do tipo AS e SC, provenientes da mesma linhagem bacteriana, estavam associadas à baixa adesão no mesmo tipo celular. Sabe-se ainda que a pilina é uma estrutura sujeita à variação antigênica, sendo esse fenômeno responsável pela variabilidade de adesão de bactérias de uma mesma linhagem (Marceau *et al.*, 1999).

De acordo com diversos autores, incluindo Nassif (1999), Stimson *et al.* (1996) e Scheuerpflug *et al.* (1999), a pilina é uma estrutura indispensável ao processo de adesão inicial de *N. meningitidis* em células endoteliais e epiteliais humanas. A fímbria do tipo IV é o principal responsável pela adesão nesses tipos celulares (Nassif *et al.*, 1999; Scheuerpflug *et al.*, 1999; Kirchner *et al.*, 2005), tais como HUVEC e Hec-1b. Uma das subunidades da pilina, a proteína PilC também possui importante papel na interação entre a célula bacteriana e as do hospedeiro, já que proteínas PilC purificadas inibem competitivamente a adesão de *N. meningitidis* em células endoteliais e epiteliais. É interessante ressaltar que a adesão de *Neisseria* mediada por *pilus* envolve respostas complexas do hospedeiro, como fluxo citosólico de  $Ca^{2+}$ , exocitose e “plaque formation” (Kirchner *et al.*, 2005).

Ademais, um estudo do transcriptoma da linhagem MC58 (sorogrupo B) durante a infecção em células epiteliais (HEp-2) e endoteliais (HBMEC) mostrou que há uma diferença quanto à regulação da expressão de uma série de genes bacterianos em contato com células de origem epitelial e endotelial. (Dietrich *et al.*, 2003). É provável que essa regulação gênica diferencial em uma mesma linhagem bacteriana esteja relacionada à presença de diferentes receptores em células hospedeiras de diferentes origens. Tal fato justificaria, em parte, o comportamento diferencial de uma mesma linhagem meningocócica nas linhagens de células HEp-2, NCI H460 e Hec-1b.

4.3.4 Morfologia de células NG97 após ensaio com *N. meningitidis*

**Figura 11.** Células NG97 (A), células NG97 após ensaio de adesão com *N. meningitidis* C2135 (B), W135 ATCC (C), P2143 (D), IAL 2443 (E) e Y USA (F). Aumento de 1000 X.

As células NG97 mostraram-se mais permissivas a alterações após a infecção por diferentes linhagens de meningococos. Mesmo sendo uma população de células heterogêneas, (Machado *et al.*, 2005), células NG97 submetidas ao teste de adesão por *N meningitidis* sofreram em sua morfologia alterações perceptíveis a microscopia óptica, tais como formação e vesículas de maior densidade citoplasmática (Figura 11 A-F).

Da mesma maneira que nos outros tipos celulares estudados, a linhagem B4 destacou-se dentre as demais em NG97. Tal linhagem bacteriana apresentou o maior valor percentual de adesão em NG97: 58,7 % ( $P < 0,001$ ; Figura 6). Ainda, células NG97 infectadas com B4 apresentaram também o maior percentual de alterações morfológicas, 67 % ( $P < 0,001$ ; Figura 7).

Células NG97 submetidas à infecção por *N. meningitidis* do sorogrupo W135 apresentaram um número relativamente pequeno de células com modificações em sua morfologia ao microscópio de luz, com 3,33; 10,33 e 8,67 % ( $P < 0,05$ ; Figura 7) para as linhagens W135 ATCC (Figura 10.C), W135 Marseille e W135 referência, respectivamente.

As linhagens B ATCC, P374, B epidêmica, P2181 e Y USA apresentaram valores de alteração de morfologia em NG97 semelhantes (Figura 7). Nas figuras 11.B, 11.D e 11.F é possível observar células NG97 com citoplasma mais denso e prolongamentos citoplasmáticos após a infecção por, respectivamente, C2135, P2143 e Y USA.

Quanto ao percentual de adesão à NG97, as linhagens meningocócicas, exceto B4, P2181 e Y USA, apresentaram valores estatisticamente próximos. As linhagens P2181 e Y USA obtiveram valores semelhantes nas taxas de adesão ( $P < 0,05$ ; Figura 6) além da taxa de alteração morfológica em NG97.

Com base nos dados obtidos, pode-se inferir que a linhagem B4 e as linhagens pertencentes ao sorogrupo W135 apresentaram comportamentos inversos em relação à aderência e capacidade de causar alteração em células NG97. Enquanto B4 apresentou valores altos para esses dois parâmetros, o sorogrupo W135 valores baixos. Entretanto, a taxa de adesão não está diretamente relacionada à taxa de alteração morfológica causada por uma linhagem bacteriana. Isso foi observado em HEp-2, NCI H460, Hec-1b e também em NG97.

Não foi possível encontrar na bibliografia estudos anteriores realizados sobre a interação entre *N. meningitidis* e células NG97.

Fowler e colaboradores (2006) compararam a interação entre linhagens de *N. meningitidis* e *N. lactamica* em contato com células de meningioma. *N. lactamica*, apesar de ser uma espécie que habita de forma comensal a nasofaringe humana, pode causar infecções como septicemia e meningite (Everts et al., 2010). Observou-se que tanto *N. meningitidis* quanto *N. lactamica* apresentam uma maior adesão a células de meninge em relação a células da mucosa epitelial respiratória (Fowler et al., 2006). Essa observação corrobora com os dados obtidos no presente trabalho com células HEp-2 e NG97. A adesão meningocócica em células NG97 foi significativamente maior em relação à adesão em células HEp-2 (Figura 6).

Sabe-se também que a pilina, presente em diversas espécies de *Neisseria*, é a principal estrutura responsável pela interação entre *N. meningitidis* a células da meninge. Acredita-se que a diferença entre o comportamento de adesão em meningiomas entre *N. meningitidis* e *N. lactamica* é justificada devido ao fato de apenas os meningococos apresentarem uma proteína associada à pilina, PilC (Fowler et al., 2006).

Com base nos resultados obtidos em células HEP-2, NCI H460, Hec-1B e NG97, pode-se inferir que as características de adesão de *N. meningitidis* não estão diretamente relacionadas às alterações provocadas nas células e que estas são tanto dependentes da linhagem meningocócica quanto do tipo celular. Tal argumento corrobora com os dados apresentados por Linhartova *et al.* (2006), entretanto, tais dados se referem a modificações na expressão gênica, e não diretamente às alterações morfológicas, de células HUVEC (células endoteliais de veia umbilical). Células HUVEC apresentaram expressão gênica diferencial após a infecção com linhagens de meningococo (MC58 – sorogrupo B) capazes de produzir pilina e aderir às células e com linhagens deficientes em fímbria e, assim, incapazes de aderir às células. Diversos genes antiapoptóticos, genes relacionados à proliferação celular e a respostas inflamatórias são ativados pela adesão meningocócica a esse tipo celular, demonstrando que a adesão desta bactéria é capaz de manipular vias de sinalização da célula hospedeira (Linhartova *et al.*, 2006).

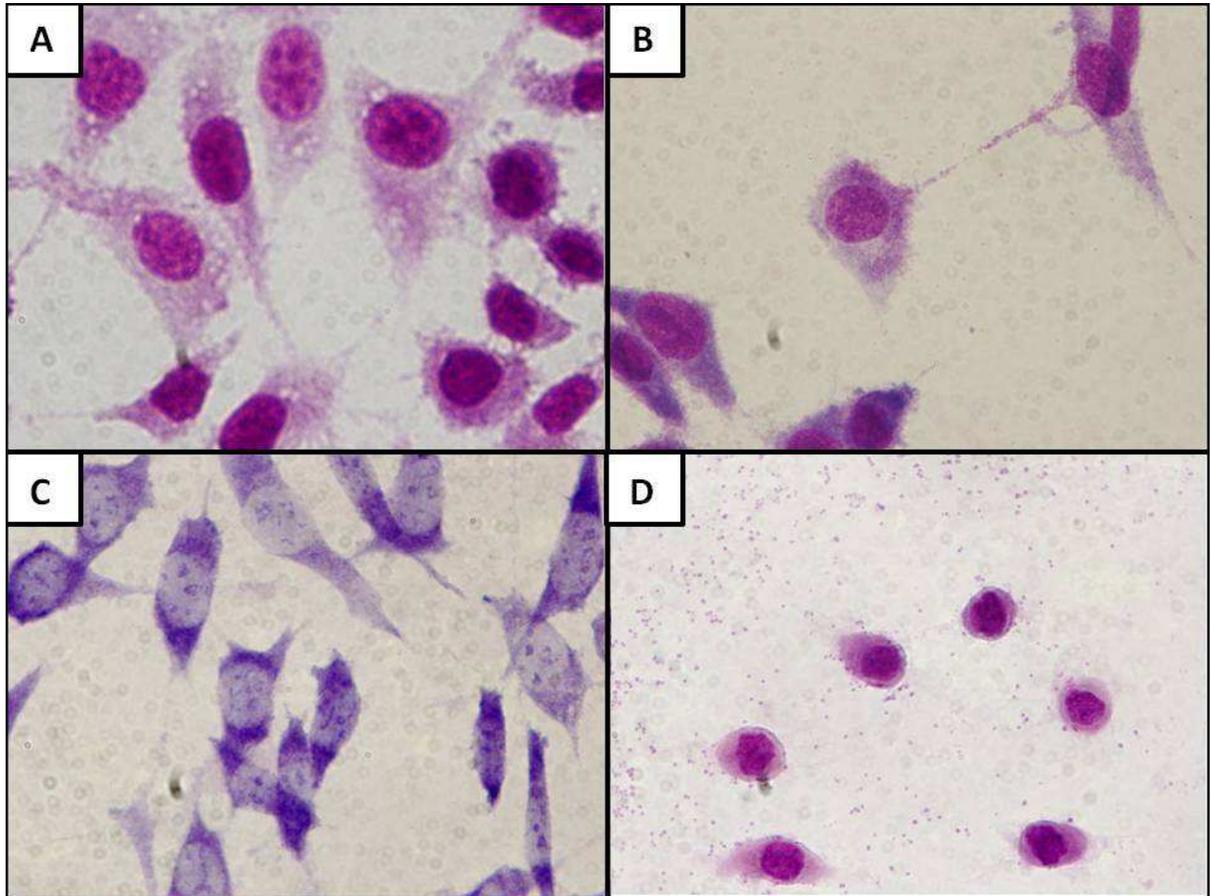
Ainda, a adesão e a interação diferenciais entre diversas linhagens meningocócicas do mesmo sorogrupo e diferentes tipos celulares, causando ou não alteração na morfologia destas células, podem ser explicados também pelo fato de que os processos de adesão e interação bactéria-célula hospedeira não são apenas dependentes da estrutura capsular bacteriana, sendo consequência do tipo de estruturas presentes na superfície das células hospedeiras, como receptores, e do tipo de estruturas presentes na superfície bacteriana, como pili, LOS e proteínas de opacidade (DeVoe, 1982; de Jonge *et al.*, 2003; Zughair *et al.*, 2004; Callaghan *et al.*, 2006). Como a expressão destas estruturas bacterianas é diferencial para cada tipo de linhagem independente do sorogrupo, a interação entre diferentes linhagens meningocócicas e o mesmo tipo celular se dará de maneira diferente, o que corrobora com os resultados obtidos.

No presente trabalho, foram utilizados quatro tipos celulares humanos derivados de diferentes sítios relacionados ao processo da doença meningocócica (trato respiratório superior e inferior, endotélio e sistema nervoso). A análise comparativa do transcriptoma de linhagens de meningococo frente à diferentes tipos de células hospedeiras mostrou que a mesma linhagem bacteriana apresenta padrões diferentes de regulação gênica dependendo do tipo celular a qual adere (Dietrich et al., 2003). Logo, a observação obtida pelo grupo de Dietrich também pode ser utilizada para justificar o comportamento diferencial de uma mesma linhagem de *N. meningitidis* em diferentes tipos celulares humanos.

Acredita-se que o comportamento diferencial de *N. meningitidis*, em diferentes tipos celulares, seja uma característica importante durante os diferentes estágios da infecção meningocócica.

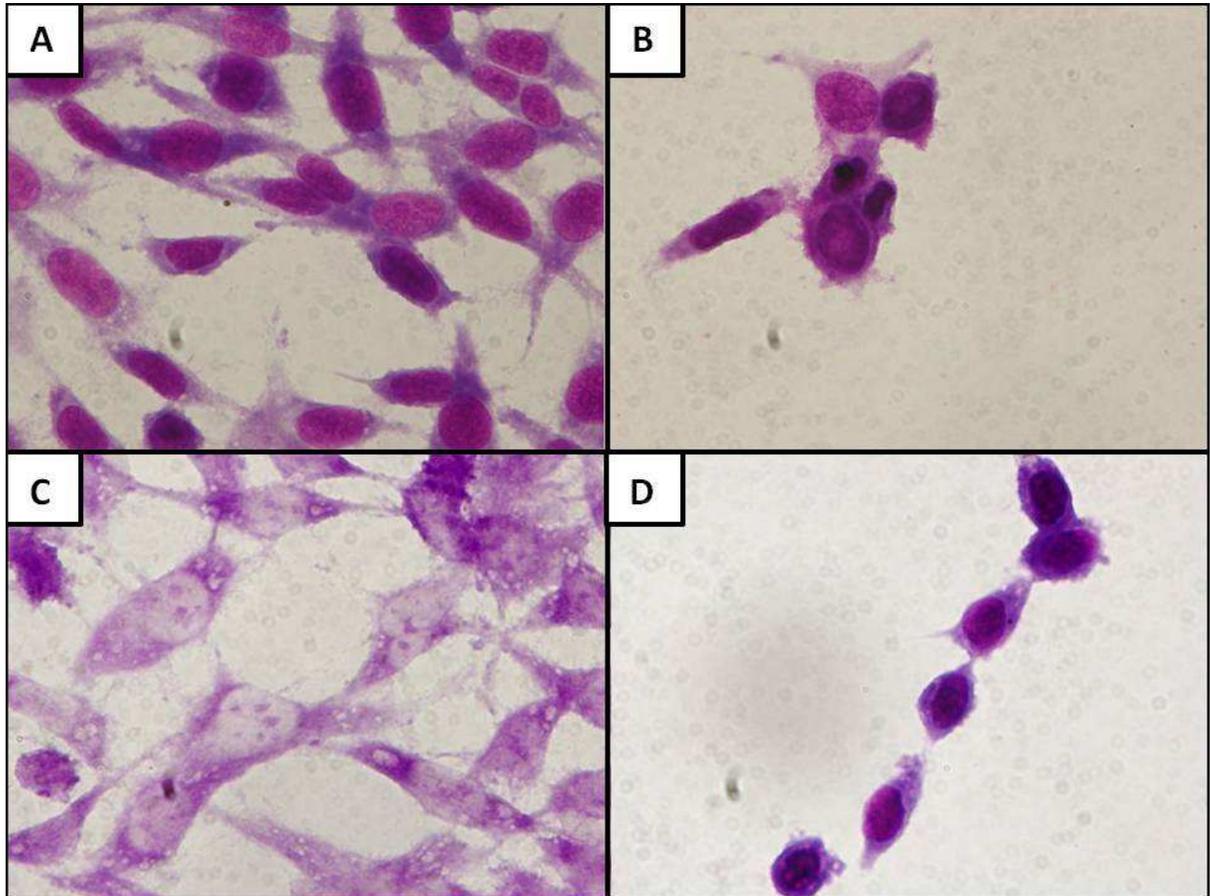
Todavia, a linhagem B4, quando comparada de maneira geral às demais linhagens de *N. meningitidis*, destacou-se perante as demais devido ao fato de apresentar valores altos de adesão para as quatro células estudadas (Figura 6). Seriam interessantes estudos futuros sobre a virulência dessa linhagem bacteriana.

4.3.5 Morfologia de co-cultura de células Hec-1B e NG97 em transwell após ensaio com *N. meningitidis*



**Figura 12.** Células NG97 em transwell (A), células NG97 em transwell após infecção do inserto superior de Hec-1b com *N. meningitidis* C2135 (B), W135 ATCC (C), B4(D). Aumento de 1000 X.

4.3.6 Morfologia de co-cultura de células Hec-1B, NG97 e HL60 em transwell após ensaio com *N. meningitidis*



**Figura 13.** Células NG97 em transwell (A), células NG97 em transwell após infecção do inserto superior de Hec-1b e HL60 com *N. meningitidis* C2135 (B), W135 ATCC (C), B4(D). Aumento de 1000 X.

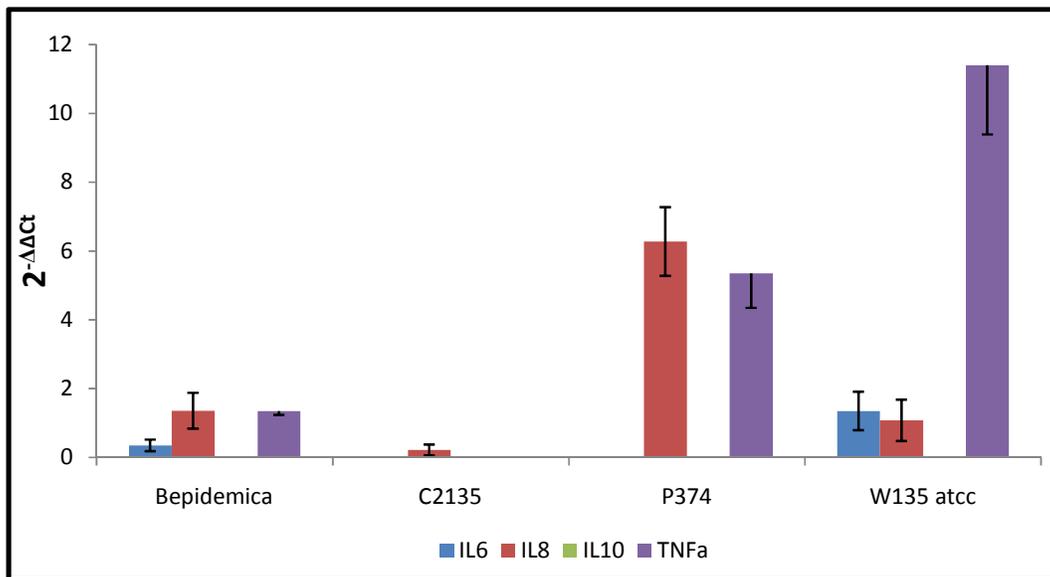
Analisando o mimetismo celular da barreira hematoencefálica, os ensaios de transwell de co-culturas de NG97 com Hec-1b com e sem células HL60 diferenciadas, observou-se que ocorreram alterações morfológicas significativas em células NG97 quando infectadas com C2135 e B4, com e sem a presença de HL60. Foi possível ainda observar, ao microscópio de luz, a presença de diplococos na parte inferior da transwell com e sem HL60 infectados com estas duas linhagens de *N. meningitidis*.

É interessante ressaltar que, aparentemente, a quantidade de meningococo na parte inferior de *transwell* infectadas com C2135 parece menor em amostras com HL60. Isso pode ser explicado pelo fato da capacidade de HL60 fagocitar de maneira eficaz diferentes linhagens de *N. meningitidis* pertencentes ao sorogrupo C (Findlow et al., 2006).

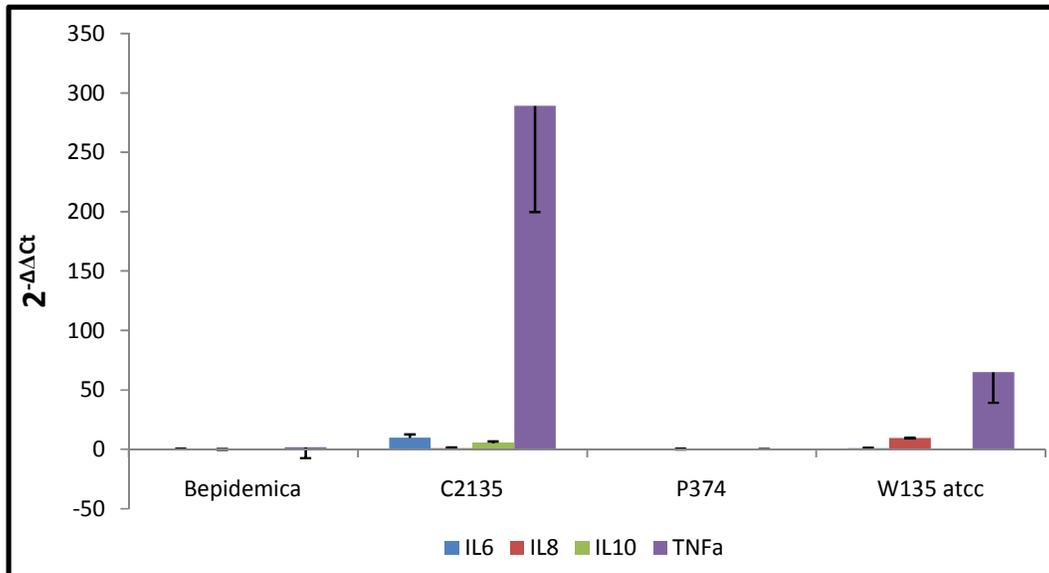
Linhagens invasivas do sorogrupo B são geralmente resistentes às atividades bactericidas do soro humano, como a fagocitose por células do sistema imune (Kahler *et al.*, 1998). Além da cápsula não-imunogênica (Read *et al.*, 1996), estas linhagens invasivas expressam de LOS com resíduos terminais de ácido siálico (Kahler *et al.*, 1998). Ainda, W135ATCC apresentou o maior valor percentual de resistência ao processo fagocitário mediado por HL60 (dados não demonstrados). Tal fato corrobora com os dados obtidos, pois apesar de não haver alteração celular significativa em NG97 em *transwell* com ou sem HL60, visualmente há um maior número de meningococos que passaram pelo inserto com Hec-1b em amostras com HL60.

#### 4.4 Avaliação do perfil de expressão de quimiocinas por qRT-PCR em monoculturas celulares

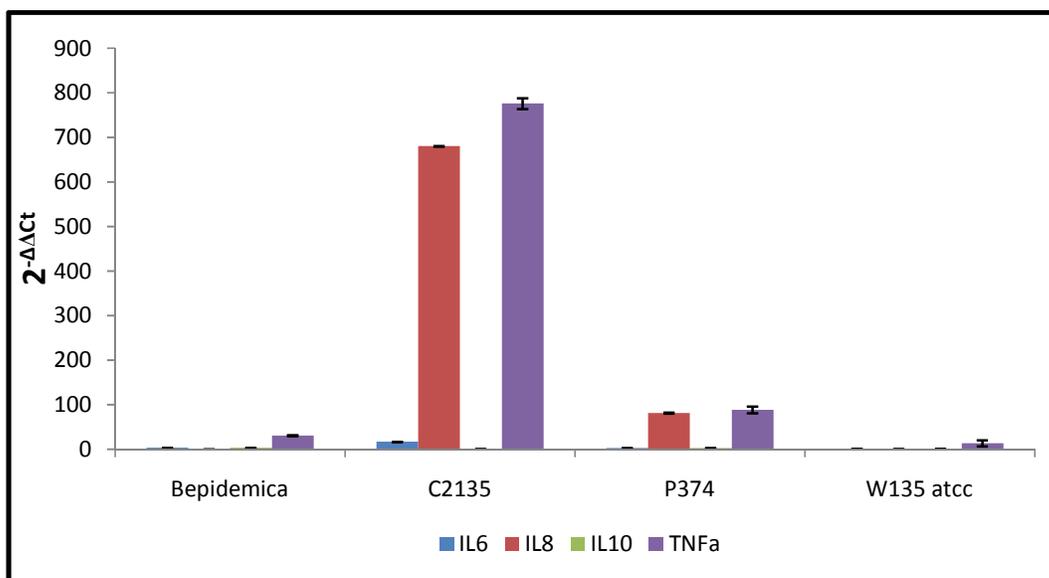
A expressão de quimiocinas inflamatórias nas células cultivadas isoladamente foi analisada através da metodologia relatada no tópico 3.2.8. Os perfis de expressão de tais moléculas para cada tipo celular estão representados nas figuras 14 a 17.



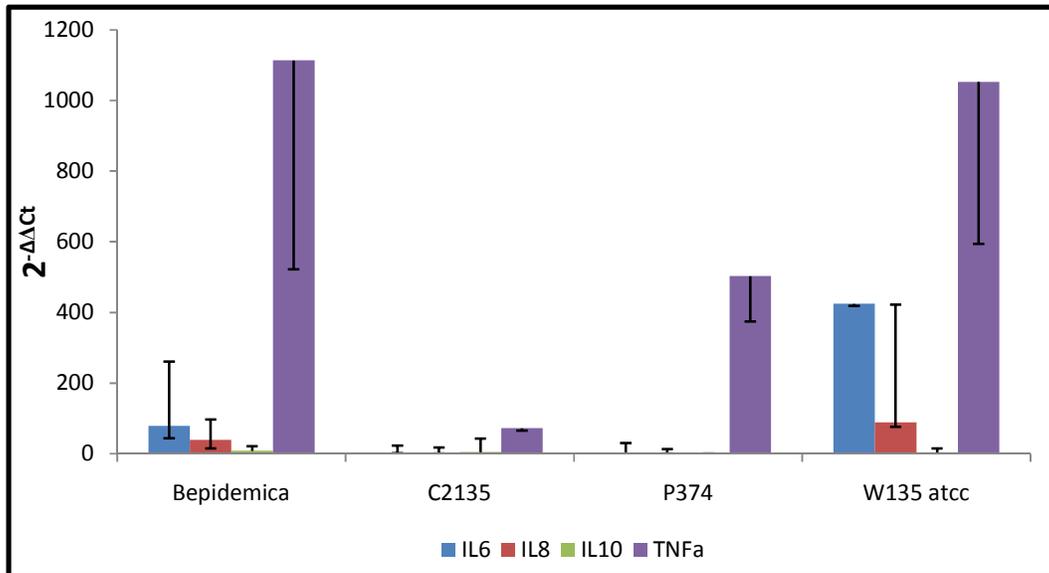
**Figura 14.** Avaliação da expressão de quimiocinas em células HEP-2: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC. As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 wells em triplicata.



**Figura 15.** Avaliação da expressão de quimiocinas em células NCI H460: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC. As reações de PCR foram realizadas em placas de 98 wells em triplicata.



**Figura 16.** Avaliação da expressão de quimiocinas em células Hec-1B: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC. As reações de PCR foram realizadas em placas de 98 wells em triplicata.



**Figura 17.** Avaliação da expressão de quimiocinas em células NG97: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B epidêmica, C2135, P374 e W135 ATCC. As reações de PCR foram realizadas em placas de 98 wells em triplicata.

Sabe-se que o processo de infecção por *N. meningitidis* é associado à expressão de determinadas quimiocinas inflamatórias.

Células HEp-2, comparadas aos demais tipos celulares utilizados, apresentaram uma baixa expressão das quimiocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  (Figura 14). Contudo, a expressão de IL-6 em células HEp-2 e NCI H460 foi semelhante para ambas as células infectadas com B epidêmica, P374 e W135<sub>ATCC</sub> (Figuras 14 e 15). A expressão de IL10 em ambos os tipos celulares foi praticamente nula, exceto em células NCI H460 infectadas com a bactéria C2135 (Figura 15). HEp-2 apresentou maior expressão de TNF $\alpha$  com a infecção por W135<sub>ATCC</sub> (Figura 14); enquanto que NCI H460 apresentou expressão significativa dessa molécula com C2135 (Figura 15).

Pouco se sabe a respeito da resposta imune relacionada à colonização meningocócica. Diversos membros do gênero *Neisseria* compartilham diversos

antígenos, assim, acredita-se que seja possível adquirir imunidade natural contra *N. meningitidis* através da colonização de espécies comensais, como *N. lactamica* (Robinson et al., 2002). Tal fato corrobora com o perfil de expressão de quimiocinas inflamatórias obtido em células HEp-2, o qual mostrou-se relativamente menor em comparação aos perfis de expressão em Hec-1B e NG97.

Em células Hec-1b, por sua vez, a expressão de citocinas foi mais elevada em comparação a células HEp-2 e NCI H460. A expressão de IL-8 e TNF- $\alpha$  foi maior quando estas foram infectadas com C2135 e P374 (Figura 16).

Células NG97 obtiveram apresentaram expressão elevada de TNF- $\alpha$  quando desafiadas com B epidêmica, P374 e W135ATCC (Figura 17). Ainda, tais células infectadas com W135 ATCC apresentaram alta expressão de IL-6.

A baixa expressão de quimiocinas inflamatórias em células HEp-2 (Figura 14) corrobora com os ínfimos valores de alteração morfológica por *N. meningitidis* neste tipo celular (Figuras 7 e 8.A-F).

A indução da expressão de TNF- $\alpha$  por infecções meningocócicas é bem fundamentada na literatura. Trata-se de uma molécula pró-inflamatória, envolvida na regulação da resposta imune e na indução de morte celular via apoptose e inflamação. Logo, os valores de expressão de TNF $\alpha$  em NCI H460 infectadas com C2135 e P374 (Figura 15) corroboram com os dados obtidos através da contagem de células com alteração morfológica, apresentando respectivamente o maior e menor valor de ambos os testes (Figura 7).

Sabe-se que o TNF- $\alpha$  é uma das mais importantes quimionas relacionadas ao choque séptico e sua liberação ocorre logo no começo deste processo fisiopatológico. A quimiocina IL-8 também é uma molécula pró-inflamatória envolvida na inflamação

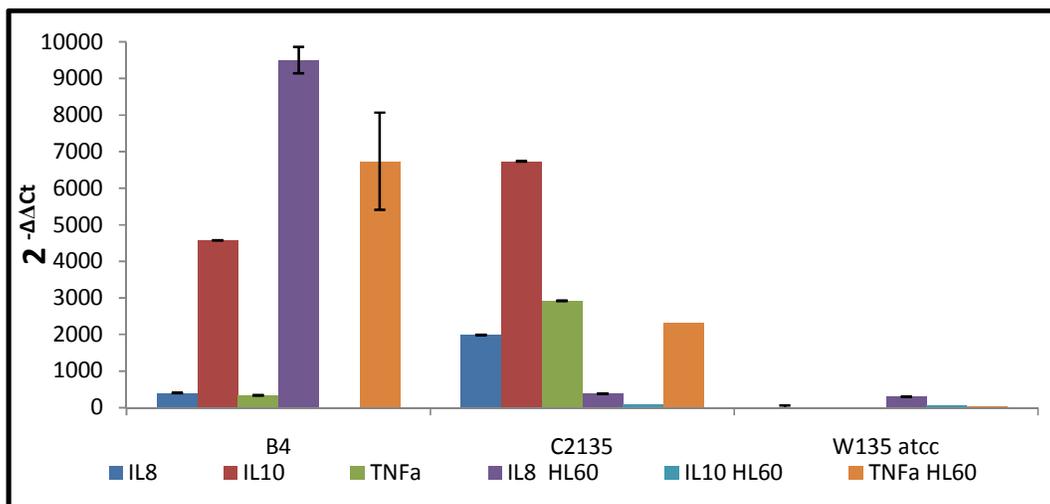
tecidual e sépsis. Trata-se de uma citocina que induz a quimiotaxia de células específicas, tais como neutrófilos (Tsiotou et al., 2005). Tendo como base estas informações, pode-se inferir que células Hec-1b, quando infectadas por C2135 e P374, foram capazes de simular o início de meningococemia por apresentaram uma alta liberação de TNF- $\alpha$  acompanhada pela liberação de IL-8.

Durante a meningite, a resposta inflamatória do hospedeiro, como a liberação de TNF- $\alpha$ , pode aumentar a permeabilidade da BHE. Tal mudança de permeabilidade está envolvida diretamente em déficits neuronais e sequelas que ocorrem em aproximadamente 1/3 dos pacientes (Schubert-Unkmeir et al., 2010). Assim, também é possível relacionar a expressão de TNF- $\alpha$  em NG97 a alterações neste tipo celular. Células NG97 infectadas com B epidêmica e P374 apresentaram altos valores dessa quimiocina (Figura 17) e alterações morfológicas (Figura 7).

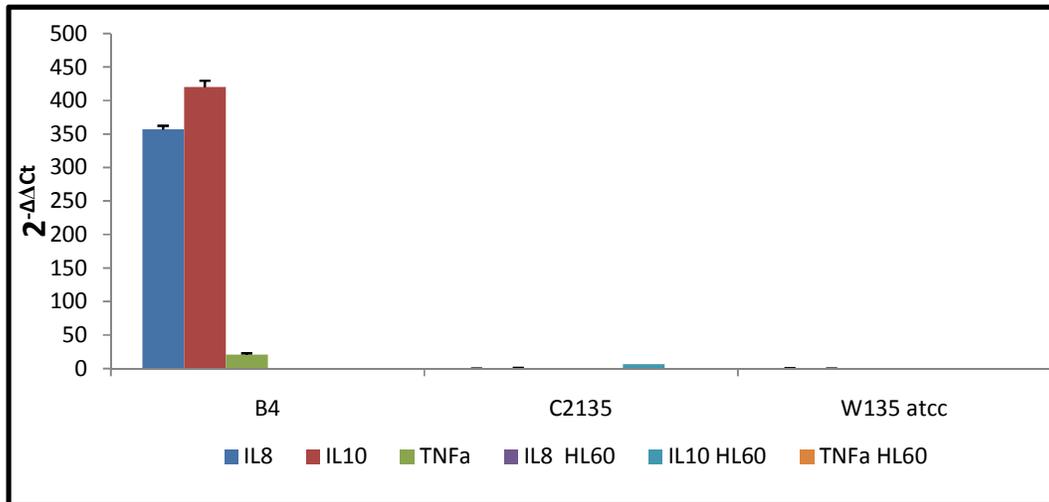
Entretanto, células NG97 infectadas com a linhagem W135ATCC, apesar da elevada expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 17) não apresentaram alteração morfológica significativa (Figuras 7 e 11.C). Isso pode ser justificado pelo fato de que tais células, infectadas com W135 ATCC, apresentaram também IL-6 em níveis elevados. Sabe-se que IL-6 é uma molécula que pode atuar como pré-inflamatória. Na presença de TNF- $\alpha$  esta molécula atua como anti-inflamatória, inibindo os efeitos causados por essa outra quimiocina.

#### 4.6 Avaliação do perfil de expressão de quimiocinas por qRT-PCR em co-culturas celulares em transwell

A expressão de quimiocinas inflamatórias células cultivadas em conjunto em transwell foi avaliada segundo a metodologia relatada no tópico 3.2.8. Os perfis de expressão de tais moléculas para células NG97 do modelo mimético *in vitro* com e sem HL60 estão representados nas figuras 18 e 19, respectivamente.



**Figura 18.** Avaliação da expressão de quimiocinas em células NG97 no ensaio de transwell com e sem HL60: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B4, C2135 e W135 ATCC. As reações de PCR foram realizadas em placas de 96 wells em triplicata.



**Figura 19.** Avaliação da expressão de quimiocinas em células Hec-1B no ensaio de transwell com e sem HL60: Valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  da quantificação da expressão das quimiocinas IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  nesta linhagem celular submetida à infecção por *N. meningitidis* B4, C2135 e W135 ATCC. As reações de PCR foram realizadas em placas de 98 wells em triplicata.

Nos ensaios de *transwell* sem HL60 com a bactéria C2135, foi possível a verificação do aumento da expressão de IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  por células NG97 (Figura 18) em comparação à células NG97 cultivadas isoladamente *in vitro* (Figura 17). A expressão de IL-8 e TNF- $\alpha$  pelo sistema mimético de BHE com HL60 infectado com C2135 (Figura 18) também apresentou valores maiores em relação a células NG97 isoladas (Figura 17).

Comparada às células infectadas com B4 e C2135, a expressão de quimiocinas inflamatórias em células desafiadas NG97 e Hec-1b do sistema mimético de BHE após a infecção com W135 ATCC foi menor, independente da presença ou não de células HL60 (Figuras 18 e 19).

Células NG97 infectadas com B4, a liberação de citocinas, exceto IL-10 foi mais elevada com a presença de HL60 (Figura 18). Contudo, as amostras de células Hec-1b

do sistema mimético de BHE sem H160 apresentaram uma maior expressão de IL-10 e IL-8 quando comparadas a células NG97 do mesmo sistema de BHE.

Ainda, é interessante ressaltar que apenas nos modelos miméticos de BHE sem HL60 foi possível detectar uma expressão significativa de IL-10 (Figuras 18 e 19).

Sabe-se que IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, sendo capaz de inibir moléculas como TNF- $\alpha$  e IL-8 (Tsiotou et al., 2005). Como sua produção e liberação ocorre em resposta a quimiocinas pró-inflamatórias, o fato de IL-10 ser apenas detectada no modelo mimético *in vitro* de BHE sugere a ocorrência de interações não somente entre as quimiocinas liberadas no meio como entre as células que fazem parte do sistema.

De modo geral, verificou-se que a expressão de quimiocinas em células NG97 dos modelos de simulação *in vitro* da BHE (Figura 18) foi aumentada em comparação a células NG97 cultivadas isoladamente (Figura 17).

Tais fatos podem ser explicados, dentre outros fatores, pelas interações entre as células que compõem o sistema de BHE e pelo tempo de infecção. Enquanto as monoculturas foram desafiadas por 3 horas, o processo de infecção da *transwell* durou 18 horas, possibilitando o estabelecimento de um processo de infecção mais avançado e, portanto, uma resposta inflamatória mais exacerbada.

É possível inferir que componentes do processo inflamatório causado pela infecção na linhagem endotelial Hec-1b do sistema *in vitro* de BHE libera fatores que aumentam cerca de 10 vezes a resposta inflamatória de células NG97 do modelo mimético, quando se analisa os valores de expressão de TNF- $\alpha$  e IL-8, por exemplo (Figura 17 e 18).

Tais dados sugerem a ocorrência de uma interação entre células endoteliais e da glia que compõem o modelo de BHE e também a possível passagem de bactérias através dessa barreira celular arquitetada. Estudos futuros mais aprofundados acerca dos mecanismos de patogenicidade de *N. meningitidis* neste sistema serão realizados para os efeitos da infecção de mutantes em estruturas antigênicas dessa bactéria, como cápsula e LOS, nesse sistema de células *in vitro*, sendo interessantes para um maior entendimento de como ocorre a interação entre este patógeno e a BHE.

Ademais, a importância do estabelecimento de tal sistema se encontra no fato de ser constituídas por células de origem humana e imortalizadas, o que permite a reprodutibilidade de tal sistema de BHE a estudos para outros patógenos, além de *N. meningitidis*, e a passagem de fármacos e outras moléculas por tal barreira.

## **CONCLUSÕES**

## **5. Conclusões**

Os resultados obtidos neste estudo levam a concluir:

- Células NG97 mostraram-se mais susceptíveis à infecção meningocócica.
- Células Hep-2 apresentaram poucas alterações morfológicas e uma baixa resposta imune frente à infecção por *N. meningitidis*.
- A linhagem meningocócica B4 destacou-se entre as demais por apresentar valores significativamente mais altos de adesão e alteração morfológica em NCI H460, Hec-1b e NG97.
- A adesão de diferentes linhagens meningocócicas em células Hep-2 (laringe), NCIH460 (pulmão), Hec1b (endotélio) e NG97 (glia), foi capaz de mimetizar o processo fisiopatológico de diferentes sítios do hospedeiro, nos quais ocorre o processo infeccioso do meningococo.
- A interação meningocócica com células humanas é regida por diversos fatores, dentre estes o tipo de célula hospedeira e o de antígenos presentes na superfície de *N. meningitidis*, independentes do sorogrupo.
- O modelo mimético de BHE demonstrou comunicação entre as células que o compõem e uma maior expressão dos níveis de quimiocinas inflamatórias, quando comparadas à infecção desta bactéria em células NG97 estudadas isoladamente.
- Não houve diferenças quanto a alterações morfológicas em NG97 dos modelos miméticos de BHE com e sem HL60, apesar de células HL60 serem capazes de fagocitar *N. meningitidis*

- O sistema de BHE foi capaz de mimetizar a infecção e a passagem do meningococo e mostra ser um modelo promissor de estudo da passagem de moléculas e patógenos através desta barreira corpórea.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **6. Referências Bibliográficas**

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M. et al.** 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurology of Disease* 37: 13-25.
- Ahmer, O. R., Essery, S. D., Saadi, A. T. et al.** 1999. The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23: 27-36.
- Ahmer, O. R., Raza, M. W., Olgivie, M. M., et al.** 1999. Binding of bacteria to HEp-2 cells infected with influenza A virus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 331-341.
- Alonso, J.M., Guiyoule, A., Zarantonelli, M.L., et al.** 2003. A model of meningococcal bacteremia after respiratory superinfection in influenzae A virus-infected mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 99-106.
- Alonso, J.-M.** 2008. Immunité et physiopathologie des infections de l'arbre respiratoire. *Médecine et maladies infectieuses* 38 : 433-437.
- Antignac, A., Alonso, J.-M., Taha, M.-K.** 2000. Le point sur la résistance de *Neisseria meningitidis* aux antibiotiques, d'après les souches étudiées au Centre National de Référence des Méningocoques en 1998. *Antibiotiques* 2 : 241-245.
- Antignac, A.** 2003. "Analyse des souches de *Neisseria meningitidis* de sensibilité diminuée à la pénicilline G". Thèse Doctorale. Paris : Université Paris VII – Denis Diderot, UFR de Biochemie.

- Aspholm, M., Aas, F. E., Harrison, O. B., et al.** 2010. Structural Alterations in a Component of Cytochrome c Oxidase and Molecular Evolution of Pathogenic *Neisseria* in Humans. *Plos Pathogens* 6 (8).
- Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard, M.** 2004. The blood-brain barrier : an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* 16 :1-13.
- Blackwell, C. C., Weir, D. M., James, V. S. et al.** 1990. Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 104:203-209.
- Brehony, C., Jolley, K. A., Maiden, M. C. J.** 2007. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 31: 15-26.
- Callaghan, M. J.; Jolley, K. A.; Maiden, M. C.** 2006. Opacity-Associated Adhesin Repertoire in Hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 74: 5085-5094.
- Caugant, D. A., Mocca, L. F., Frasch, C. E., et al.** 1987. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J. Bacteriol.* 169: 2781-2792.
- Cartwright, K. A. V., Stuart, J. M., Jones, D. M. et al.** 1987. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidem Inf* 99: 591-601.
- Cartwright, K. A. V.** 1995. Meningococcal carriage and disease. In *Meningococcal disease*. Cartwright, K. (ed). Chichester: John Wiley and sons. 115-146.
- Christodoulides, M., Makepeace, B. L., Partridge, K. A. et al.** 2002. Interaction of *Neisseria meningitidis* with Human Meningeal Cells Induces the Secretion of a

- Distinct Group of Chemotactic Proinflammatory, and Growth-Factor Cytokines. *Infect. Immun* 70: 4035-4044.
- de Jonge, M. I.; Vidarsson, G.; van Dijken, H. H.; et al.** 2003. Functional Activity of Antibodies against the Recombinant OpaJ Protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 71: 2331-2340.
- de Vries, F. P., van der Ende, A., van Putten, J. P. M., et al.** 1996. Invasion of Primary Nasopharyngeal Epithelial Cells by *Neisseria meningitidis* Is Controlled by Phase Variation of Multiple Surface Antigens. *Infect. Immun.* 64: 2998-3006.
- DeVoe, I. W.** 1982. The Meningococcus and Mechanisms of Pathogenicity. *Microbiol Reviews* 46: 162-190.
- Deghmane, A.E., Veckerlé, C., Giorgini, D., et al.** 2009. Differential Modulation of TNF- $\alpha$  Induced Apoptosis by *Neisseria meningitidis*. *PLoS Pathogens* 5: e100040.
- Deghmane, A.E., Giorgini, D., Larribe, M., et al.** 2002. Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol Microbiol.* 43: 1555–1564.
- Dietrich, G., Kurz, S., Hübner, C., et al.** 2003. Transcriptome Analysis of *Neisseria meningitidis* during Infection. *Journal of Bacteriology* 185:155-164.
- Dollan-Livengood, J.M., Miller, Y.K., Martin, et al.** 2003. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 187: 1616-1628.
- Dubnau, D.** 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 217-244.
- Dunn, K. L., Jayne, R., Farrant, L., et al.** 2003. Bacterial [Cu,Zn]-Cofactored Superoxide Dismutase Protects Opsonized, Encapsulated *Neisseria meningitidis*

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

**Duport, S., Robert, F., Muller, D. et al.** 1998. An *in vitro* blood-brain barrier model : Cocultures between endothelial cells organotypic brain slice cultures. *Neurobiology* 95: 1840-1845.

**El Ahmer, O. R., Raza, M. W., Olgivie, M. M., et al.** 1999. Binding of bacteria to HEp-2 cells infected with influenza A virus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 331-341.

**Engelhardt, B., Sorokin, L.** 2009. The blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31: 497-511.

**Everts, R. J., Speers, D., George, S. T.** 2010. *Neisseria lactamica* Arthritis and Septicemia Complicating Myeloma. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (6): 2318.

**Ferreira, C. G., Span, S. W., Peters, G. J., et al.** 2000. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Res.* 24: 7133-7141.

**Findlow, J., Taylor, S., Aase, A., et al.** 2006. Comparison and correlation of neisseria meningitidis serogroup B immunologic assay results and human antibody responses following three doses of the Norwegian meningococcal outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Infect Immun* 74: 4557-4565.

**Fowler, M. I., Ho Wang Yin, K. Humphries, H. E., et al.** 2006. Comparison of the Inflammatory Responses of Human Meningeal Cells following Challenge with

*Neisseria lactamica* and with *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun 74:6467-6478.

**Galimand, M., Gerbaud, G., Courvalin, P.** 2000. Spectinomycin Resistance in *Neisseria* spp Due to Mutations in 16S rRNA. Antimicrob. Agents Chemoth. 44: 1365-1366.

**Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H., C. et al.** 2003. In search of the astrocyte factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. Cellular and Molecular Neurobiology 25 (1): 25-39.

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

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

**Horton, R. E., Vidarsson, G, Virji, M. et al.** 2009. IgA1 antibodies specific for outer membrane protein PorA modulate the interaction between *Neisseria meningitidis* and the epithelium. Microbial Pathogenesis. 46, 253-260.

**Ingalss, R. R., Lien, E., Golenbock, D. T.** 2001. Membrane-associated proteins of a lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through toll-like receptor 2. Infection and Immunity 69: 2230-2236.

**Janzer, R. C., Raff, M. C.** 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. Nature 325: 253-257.

- Jennings, M.P., Srikhanta, Y.N., Moxon, E.R. et al.** 1999. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. Microbiol. 145: 3013-3021.
- Johansson, L., Rytkönen, A., Bergman, P., et al.** 2003. CD46 in Meningococcal Disease. Science 301: 373-375.
- Joó, F., Karnushina, I.** 1973. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. Cytobios 8 (29): 41-48.
- Kahler, C. M.; Martin, L. E.; Shih, G. C.; et al.** 1998. The ( $\alpha\rightarrow 8$ )- Linked Polysialic Acid Capsule and Lipooligosaccharide Structure Both Contribute to the Ability of Serogroup B *Neisseria meningitidis* To Resist the Bactericidal Activity of Normal Human Serum. Infect. Immun 66: 5939-5947.
- Kirchner, M., Heuer, D, Meyer, T. F.** 2005. CD-46-Independent Binding of Neisserial Type IV Pili and the Major Pilus Adhesin, PilC, to Human Epithelial Cells. Infect. Immun 73:3072-3082.
- Knapp, J. S., Clark, V. L.** 1984. Anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae* coupled to nitrite reduction. Infect Immun 46: 176-181.
- Koll, T. T., Feis S. S., Wright, M. H. et al.** 2008. HSP90 inhibitor, DMAG, synergizes with radiation of lung cancer cells by interfering with base excision and ATM-mediated DNA repair. Mol Cancer Ther. 7, 1985-1992.
- Kornelisse, R. F., Hack, C. E., Savelkoup, H. F. J.** 1997. Intrathecal production of interleukin-12 and gamma interferon in patients with bacterial meningitis. Infect. Immun. 65: 877-881.

- Kyungcheo, Y. Stephens, D. S., Stojiljkovic, I.** 2003. Development and Evaluation of an Improved Mouse Model of Meningococcal Colonization. *Infection and Immunity* 71:1849-1855.
- Kusch-Poddar, M., Drewe, J., Fux, I., et al.** 2005. Evaluation of the immortalized human brain capillary endothelial cell line BB19 as a human cell culture model for the blood-brain barrier. *Brain Res* 1064: 21–31.
- Lancellotti, M.** 2005. 'Rôle de la capsule dans la virulence de *Neisseria meningitidis*'. Thèse Doctorale.. Paris : Université Paris VII – Denis Diderot, UFR de Biologie Moléculaire et Cellulaire.
- Lancellotti, M., Guiyoule, A., Ruckly, C., et al.** 2006. Capsule switching C to B in clinical isolates of *Neisseria meningitidis* of the clonal complex ET-37/ST-11 with conserved virulence. *Microb. Infect.* 8: 191-196.
- Linhartova, I., Basier, M., Ichikawa, J., et al.** 2006. Meningococcal adhesion suppresses proapoptotic gene expression and promotes expression of genes supporting early embryonic and cytoprotective signaling of human endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 263:109-118.
- Machado, C. M. L., Schenka, A., Vassalo, J, et al.** 2005. Morphological characterization of a human glioma cell line. *Cancer Cell International* 5 :13.
- Maiden, M. C. J., Caugant, D. A.** 2006. The Population Biology of *Neisseria meningitidis*: Implications for Meningococcal Disease, Epidemiology and Control. In: Frosch, M., Maiden M., eds. *Handbook of Meningococcal Disease*. Weinheim: Wiley-VGH-Verlag:17-28.

- Mairey, E., Genovesio, A., Donnadiou, E., et al.** 2006. Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp. Med.* 203: 1939-1950.
- Malina, K. C., Cooper, I., Teichberg, V. I.** 2009. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood brain barrier tightness. *Brain Research* 1284: 12-21.
- Marceau, M., Nassif, X.** 1999. Role of Glycosylation at Ser63 in Production of Soluble Pilin in Pathogenic *Neisseria*. *Journal of Bacteriology* 181: 656-661.
- Massari, P., Ho, Y., Wetzler, L. M.** 2000. *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9070-9075.
- Moore, A. E., Sabachewsky, L., Toolan, H. W.** 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* 15 (9): 598-602.
- Muruganandam A., Herx L. M., Monette R., et al.** 1997. Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *FASEB J.* 11, 1187-1197.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S. et al.** 2007. Pericytes from Brain Microvessels Strengthen the Barrier Integrity in Primary Cultures of Rat Brain Endothelial Cells. *Cell Mol Neurobiol* 27: 687-694.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., et al.** 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International* 54:253-263.

- Nassif, X.** 1999. Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eukaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*. *Current opinion in Microbiology* 2: 71-77.
- Petty, M. A., Lo, E. H.** 2002. Junctional complexes of the blood-brain barrier : permeability changes in neuroinflammation. *Progress in Neurobiology* 68 : 311-323.
- Pron, B., Taha, M.-K., Rambaud, C., et al.** 1997. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the Components of the Blood-Brain Barrier Correlates with an Increased Expression of P1C. *J Infect Dis.* 176: 1285-1292.
- Raza, M. V., Ogilvie, M. M., Blackwell, C. C., et al.** 1993. Effect of respiratory syncytial virus infection on binding of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b to a human epithelial cell line (HEp-2). *Epidemiol Infect.* 2:339-347.
- Read, R. C., S. Zimmerli, C. Broaddus, D. A. et al.** 1996. The (α2→8)-linked polysialic acid capsule of group B *Neisseria meningitidis* modifies multiple steps during interaction with human macrophages. *Infect. Immun.* 64: 3210-3217.
- Robinson, K., Neal, K. R., Howard, C.** 2002. Characterization of Humoral and Cellular Immune Responses Elited by Meningococcal Carriage. *Infect. Immun.* 70 (3): 1301-1309.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Barbu, P. K. et al.** 1991. A Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier. *The Journal of Cell Biology* 115: 1725-1735.

- Sano, Y., Shimizu, F., Abe, M., et al.** 2010. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. *Journal of Cellular Physiology* 225: 519-528
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Scalettsky, I. A. C., Silva, M. L. M., Trabulsi, L. R.** 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 45: 534-536.
- Scherrmann, J. M.** 2002. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascular Pharmacology* 38: 349-354.
- Schneider, H., Hale, T.L., Zollinger, W.D. et al.** 1984. Heterogeneity of molecular size and antigenic expression within lipooligosaccharides of individual strains of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 45: 544-549.
- Scheuerpflug, I., Rudel, T., Ryll, R., et al.** 1999. Roles of PilC and PilE Proteins in Pilus-Mediated Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to Human Erythrocytes and Endothelial and Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 67: 834-843.
- Schubert-Unkmeir, A., Konrad, C., Slanina, H., et al.** 2010. *Neisseria meningitidis* induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathogen* 6: e1000874.
- Spence, J. M., Clark, V. L.** 2000. Role of Ribosomal Protein L12 in Gonococcal Invasion of Hec1b Cells. *Infect. Immun* 68: 5002-5010.

- Stephens, D., Greenwood, B., Brandtzaeg, P.** 2007. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 369: 2196-2206.
- Swartley, J.S., Marfin, A.A., Edupuganti, S., et al.** 1997. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 271-276.
- Stimson, E., Virji, M., Barker, S, et al.** 1996. Discovery of a novel protein modification:  $\alpha$ -glycerophosphate is a substituent of meningococcal pilin. *Biochem. J.* 316:29-33.
- Taha, M.-K., Deghmane, A.-E., Antignac, A. et al.** 2002. The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. *TRENDS in Microbiol.* 1: 376-382.
- Terasaki, T., Ohtsuki, S., Hori, S., et al.** 2003. New approaches to in vitro models of blood–brain barrier drug transport. *Drug Discov. Today* 8: 944–954.
- Tobiason, D. M., Seifert, H. S.** 2001. Inverse relationship between pilus-mediated gonococcal adherence and surface expression of the pilus receptor, CD46. *Microbiol* 141:2333-2340.
- Tonjum, T., Koomeyb, M.** 1997. The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships – a review. *Gene* 192: 155-163.
- Tsiotou, A. G., Sakorafas, G. H., Anagnostopoulos, G, et al.** 2005. Septic Shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit* 11 (3) : 76-85.
- Urwin, R., Russel, J. E., Thompson, E. A. L., et al.** 2004. Distribution of Surface Protein Variants among Hyperinvasive Meningococci: Implications for Vaccine Design. *Infect. Immun.* 72: 5955-5962.

- van der Ley, P., Heckels, J. E., Virji, M., et al.** 1991. Topology of Outer Membrane Porins in Pathogenic *Neisseria* spp. *Infect. Immun.* 5: 2963-2971.
- van der Woud, M. W., Bäumlner, A. J.** 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiol. Reviews* 17: 581-611.
- van Deuren, M., Brandtzaeg, P., van der Meer, J. M.** 2000. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 13 (1): 144-166.
- Vermont, C. L., de Groot, R., Hazelnet, J. A.** 2002. Bench-to-bedside review : Genetic influences on meningococcal disease. *Critical Care* 6:60-65.
- Weksler, B. B., Subilcau, E. A., Perrière, N., et al.** 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FAESB Journal* 19: 1872-1874.
- Winstead, J. M., McKinsey, D. S., Tasker, S., et al.** 2000. Meningococcal Pneumonia: Characterization and Review of Cases Seen Over the Past 25 Years. *Clinical Infectious Diseases* 30:87-94.
- Zarantonelli, M. L., Huerre, M., Taha, M.-K. et al.** 2006. Differential Role of Lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* in Virulence and Inflammatory Response during Respiratory Infection in Mice. *Infection and Immunity* 74 (10): 5506-5512.
- Zarantonelli, M.-L., Szatanik, M., Giorgini, D., et al.** 2007. Transgenic Mice Expressing Human Transferrin as a Model for Meningococcal Infection. *Infection and Immunity* 75: 56009-5614.

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