LUCIANA TENDOLINI BRITO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES VIAS DE IMUNIZAÇÃO COM NOVO ADJUVANTE
PARA NEISSERIA MENINGITIDIS EM DIFERENTES LINHAGENS DE
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Natal de Gaspari

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

BRITO, L. T. **Avaliação de diferentes vias de imunização com novo adjuvante para *Neisseria meningitidis* em diferentes linhagens de camundongos.** 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Na primeira parte do estudo camundongos Swiss foram imunizados por diferentes vias de imunização com OMVs de *Neisseria meningitidis* com DDA-BF ou HA como adjuvantes. Os adjuvantes e diferentes vias foram comparados quanto às respostas imunes por meio de ELISA, Immunoblot, HTT e análise histopatológica. Os animais imunizados apenas com adjuvantes não produziram títulos de anticorpos. Após única dose e decorridos 15 dias, a imunização com HA e antígeno apresentou títulos de IgG mais altos em relação ao DDA-BF nas vias subcutânea, intraperitoneal e intramuscular. Após 2 doses e 66 dias, todas as vias exibiram títulos de IgG, sendo as que receberam o HA com OMVs produziram títulos discretamente mais altos e ainda altos índices de avidéz. O perfil da resposta imune quanto ao padrão Th1/Th2 foi avaliado. Ambos adjuvantes promoveram a produção de IgG2a, as respostas variaram de acordo com as vias de imunização utilizada. Enquanto as vias subcutânea e intramuscular induziram títulos semelhantes de IgG2a para ambos adjuvantes, a via intraperitoneal com DDA teve título mais alto. A produção de IgG1 foi modulada apenas por HA, sendo mais robusta na via subcutânea, seguida pela intramuscular com valores muito próximos aos da intraperitoneal. Camundongos isogênicos Balb/c H2^d e C57Bl/6J H2^b foram imunizados pela via subcutânea. Foram avaliadas as produções de anticorpos do tipo IgG, IgG1 e IgG2a, bem como o índice de avidéz de IgG. De modo geral, os grupos de OMVs HA induziram maior produção de anticorpos que OMVs DDA ou apenas OMVs, enquanto os controles HA, DDA e salina não apresentaram níveis de anticorpos. Pelas técnicas utilizadas no estudo não observamos uma diferença significativa entre os dois adjuvantes utilizados independente da via e da linhagem de camundongos utilizados.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis* B. Vesículas de membrana externa. DDA-BF. Adjuvantes. Linhagens isogênicas. Análise histopatológica

ABSTRACT

BRITO, L. T. **Evaluation of different immunization routes with new adjuvant for *Neisseria meningitidis* in different strains of mouse.** 2015. 110 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In the first part of the study Swiss mice were immunized by different routes of immunization with OMVs of *Neisseria meningitidis* with DDA-BF or HA as adjuvants. Adjuvants and different routes were compared regarding immune responses through ELISA, Immunoblot, HTT and histopathological analysis. Animals immunized with only adjuvants did not produce evidence of antibodies. After single dose and 15 days, of immunization with HA presented antigen specific IgG higher in relation to the DDA-BF in the subcutaneous, intraperitoneal and intramuscular immunization. After 2 doses and 66 days, all exhibited IgG, and the bonds that received the HA with OMVs produced titles discreetly higher and still high levels of antibodies. The profile of the immune response to Th1/Th2 pattern has been evaluated. Both adjuvants promoted the production of IgG2a, the responses varied according to the immunization routes used. While the subcutaneous and intramuscular routes induced similar titles of IgG2a to both adjuvant intraperitoneal route with had highest title. IgG1 production was modulated only by HA, being more robust in subcutaneous injection, followed by intramuscular with values very close to those of intraperitoneal. Isogenic Balb/c and C57Bl/6J H2d H2b mice were immunized by subcutaneous administration. Been evaluated antibody production of type IgG, IgG1 and IgG2a, as well as the IgG avidity index. In General, the greater production of OMVs HA induced antibodies that OMVs DDA or just OMVs, while the controls .DDA-BF and controls showed no antibody levels. The techniques used in the study did not observe a significant difference between the two adjuvants used independent of the route and of mice strains used.

Keywords: *Neisseria meningitidis* B. outer membrane vesicles. DDA-BF. Adjuvants. strains of mice .Histopathological Analysis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Patógeno exclusivamente humano que, similarmente a outras bactérias Gram negativas, é circundado por uma membrana externa, composta por lipídios, proteínas (OMPs) e lipopolissacarídes (LPS), os meningococos são envolvidos por uma cápsula polissacarídica, associada a esta membrana externa.

A classificação dos meningococos é feita em sorotipos de acordo com as proteínas PorB e soro subtipos de acordo com suas proteínas PorA. Já os imunotipos são determinados pela composição da cadeia polissacarídica do LPS. Sendo assim, uma cepa de *Neisseria meningitidis* caracterizada como B:4:P1.9 (FRASCH et al., 1985) corresponde à classificação em sorogrupo (B), sorotipo (4), subtipo (P1.9).

A mucosa nasofaríngea humana é o único reservatório da *N. meningitidis*. Os meningococos são transferidos de uma pessoa a outra por contato direto ou via gotículas de saliva (NELSON, 1996). O autor sugere que a probabilidade da sobrevivência da bactéria nestas gotículas seja influenciada pelas condições climatológicas tais como, temperatura e umidade e que durante períodos de epidemia a infecção pode atingir cerca de 10% da população.

Os índices de transmissão de clones virulentos são altos e a doença invasiva pode ocorrer na primeira semana após o contágio (MARKS et al., 1979), enquanto outras pessoas podem albergar a cepa por muitos meses ou anos sem ficarem doentes (KRISTIANSEN et al., 1998) – são os chamados de indivíduos portadores (YAZDANKHAH; CAUGANT, 2004).

Os sorotipos têm incidência variável, tanto por região como no decorrer do tempo. São cerca de 500.000 casos anualmente de doença meningocócica em todo o mundo, causando em torno de 50.000 mortes (OMS). No Brasil, foram registrados cerca de 3 mil casos e aproximadamente 600 mortes em 2010. A vacina ainda é o melhor meio profilático, embora não esteja disponível na rede pública para o sorogrupo B.

Atualmente, para a faixa etária abaixo de 6 anos, são oferecidas as vacinas contra *Haemophilus influenzae* B (Hib), *Neisseria meningitidis* C e *Streptococcus pneumoniae* pela rede pública do Estado de São Paulo (Centro de Vigilância Epidemiológica- CVE, 2014).

Em 2010 a vacina conjugada meningocócica contra o sorogrupo C, o mais prevalente no país atualmente, foi incluída no calendário vacinal da criança na rede pública de saúde. Embora não seja possível avaliar ainda o efeito da introdução da vacina, Gonçalves e

colaboradores (2014) levantaram que 61% dos 134 casos de meningite meningocócica que ocorreram entre 2001 e 2012 em Curitiba-PR pertenciam ao sorogrupo B. A faixa etária mais atingida pela doença foi a de menores de 5 anos de idade, com aproximadamente 44% dos casos.

Em 1988 houve uma epidemia na Grande São Paulo causada por *N.meningitidis* B:4:P1.15 essa epidemia diferenciou-se das anteriores por ser do sorogrupo B e perdurou até 1990 (SACCHI et al., 1992).

Atualmente sorogrupo B é o mais prevalente em países desenvolvidos, mas não no Brasil, onde teve queda acentuada na década de 90 e recentemente leve aumento na participação entre os sorogrupos. (Fig.1) (CVE, 2014). Entretanto, não há vacina disponível e o risco de epidemia deve ser considerado, visto a prevalência desde 2001 na Argentina, país vizinho e de intensa relação turística com o Brasil (Fig. 2).

Figura 1 - Distribuição percentual por sorogrupo no Estado de São Paulo. O sorogrupo B apresentou queda na incidência na última década, mas está voltando a crescer nos últimos 4 anos.

Fonte: SINAN/ D.D.T.R./CVE - Atualização em 09/03/2015.

Desde 1998, com a implantação da vacina anti-*Haemophilus influenzae* tipo B para menores de um ano no calendário de vacinação, em todo o país, tem sido observada a redução da incidência dessa meningite bacteriana (BRASIL, 1998). A partir de 2007, com a

introdução do diagnóstico por PCR, houve redução de meningites bacterianas não determinadas (Fig 3) .

Figura 2 - Distribuição global do meningococo por sorogrupo.

Fonte: Disponível em http://meningitisinfo.com/Epidemiology_ssi.aspx. Acesso em 14 jun 2015.

Figura 3 - Distribuição percentual segundo etiologias no Estado de São Paulo entre os anos de 1998 e 2014. É crescente a porcentagem das etiologias de origem conhecida e decrescente a incidência de H. influenzae após a introdução, respectivamente, da técnica de PCR na rotina e da vacinação.

Fonte: SINAN/ D.D.T.R./CVE - Atualização em 09/03/2015.

1.2 TRAJETÓRIA TECNOLÓGICA

A doença meningocócica (DM) ocorre em pacientes com deficiência de anticorpos bactericidas e/ou opsonizadores (MARTINEZ et al., 2002), consequentemente, a melhor forma de prevenir a doença é a indução à produção destes anticorpos pela vacinação.

O desenvolvimento de uma vacina contra o sorogrupo B enfrenta um problema ainda maior devido à similaridade entre a estrutura capsular do polissacáride B e o ácido polisiálico contendo glicopeptídeos que faz parte do tecido cerebral humano, pois não induz anticorpos com atividade soro bactericida, mas que são reconhecidos como moléculas de adesão celular neuronais. Por isso, os estudos atuais contemplam o uso de antígenos vacinais derivados de vesículas de membrana externa do meningococo e/ou vacinologia reversa.

Nos anos 70, vacinas foram produzidas a partir dos polissacárides capsulares do meningococo, efetivas contra os sorogrupos A e C. Depois, nos Estados Unidos, uma vacina quadrivalente contendo meningococos dos sorogrupos A, C, Y e W-135 demonstrou eficácia, porém apenas para indivíduos acima de dois anos de idade.

As vacinas polissacarídicas apresentam limitações, pois não são imunogênicas em crianças abaixo de dois anos de idade – principal faixa etária afetada (Fig.4) – e nas outras faixas etárias, a resposta imune é de curta duração. Isso ocorre porque os antígenos de natureza polissacarídica induzem a produção de anticorpos sem auxílio de linfócitos T, geralmente do tipo IgM, mas sem produção de memória imunológica. Quando o sistema imune é imaturo, não há produção de anticorpos.

Figura 4 - A incidência de Doença meningocócica é maior entre as crianças menores de dois anos de vida.

Fonte: SINAN/D.D.T.R./CVE- Atualização em 09/03/2015.

Para melhorar a resposta imune, propiciando memória, os antígenos polissacarídicos foram conjugados com proteínas, e em 1992 foi liberada a primeira vacina conjugada contra meningococo A e C. Em 1999 uma vacina conjugada contra o sorogrupo C foi licenciada no Reino Unido. Para a cobertura de vários sorogrupos, em 2003 foi licenciada uma vacina conjugada quadrivalente, contra meningococos A, C, Y e W, mas para uso apenas em indivíduos acima de 11 anos de idade. Apenas em 2010 foi licenciada uma vacina monovalente contra meningococo A na África.

O uso permitido em crianças a partir de dois meses de vida ocorreu em 2012/2013, com vacina conjugada quadrivalente, contra meningococo A, C, Y e W, mas ainda não era contemplado o sorogrupo B.

Vipond e colaboradores (2012) revisaram o histórico das vacinas meningocócicas (Fig.7). Nos anos 60, foram desenvolvidas vacinas polissacarídicas baseadas nas cápsulas dos sorogrupos A e C. No momento está disponível uma vacina quadrivalente contendo os grupos A, C, W-135 e Y (LEPOW et al., 1986). A vacinação tem sido efetiva no combate a surtos comunitários e epidemias em centros militares (ROSENSTEIN et al., 1998). De maneira similar, essa vacina é capaz de controlar grandes epidemias em países da África, situados no chamado “cinturão da meningite”, promovendo segurança adequada (VEEKEN et al., 1998). Porém, Moore et al. (1998) em estudos com vacinação de viajantes, verificaram que a

vacinação contra esses sorogrupos não reduz a transferência da bactéria de indivíduos para indivíduos. Peltola et al. (1977) e Ceesay et al. (1993) questionam o valor dessas vacinas polissacarídicas, demonstrando que além de não induzirem memória imunológica, são pouco imunogênicas em crianças menores de dois anos de idade. A indução de memória imunológica e uma maior eficácia em crianças podem ser alcançadas pela conjugação da vacina polissacarídica a uma proteína (FRASCH, 1989; GRANOFF et al., 1997).

Em 2011, foi lançada no Brasil a vacina meningocócica conjugada A, C, W, Y, internacionalmente conhecida como Menveo® (Novartis, Itália), a primeira no país que previne contra quatro (A, C, W-135 e Y) dos cinco principais sorogrupos da meningite meningocócica. Entretanto, é indicada para imunização de adolescentes maiores de 11 anos e adultos (NOVARTIS, 2011), não atendendo a necessidade das crianças menores de 2 anos, além de não ser fornecida pelo serviço público e não oferecer proteção contra o tipo B.

Também da empresa Novartis, a vacina Bexsero (4CMenB - *Multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine*) é baseada na tecnologia de vacinologia reversa associada ao uso de OMVs. Essa vacina, usando o genoma do meningococo B para selecionar as proteínas que são provavelmente mais amplamente eficazes como constituintes da vacina, produzindo recombinantes delas (RAPPUOLI, 2001) e associando-as à OMVs, é composta pelas seguintes proteínas recombinantes: proteína de fusão NHBA, proteína NadA e proteína de fusão fHbp e OMVs de *N. meningitidis* cepa NZ98/254. Essa vacina foi precedida por uma chamada 5CMenB, com 5 componentes antigênicos: Adesina A de *Neisseria* (NadA), proteína de ligação fator H (fHpb) e antígenos de ligação à heparina (proteínas GNA2132, GNA1030 e GNA1870) e OMVs de *N. meningitidis* cepa NZ98/254 (GIULIANI et al., 2006). Com perfil aceitável de tolerância (BEERETZ et al., 2011; GOSSGER et al., 2012) e boa cobertura vacinal na Grécia (TZANAKAKI et al., 2014), é indicada para imunização intramuscular a partir de 2 meses de vida (EMA, 2012). Essa vacina já foi aprovada na Europa, Canadá e Austrália e recentemente foi indicada nos Estados Unidos para calouros em uma universidade (NOVARTIS, 2014).

Já a vacina Trumenba (Pfizer) acaba de ser liberada pelo FDA (FDA, 2014) para a faixa etária de 10-25 anos. Essa vacina é composta apenas por 2 proteínas recombinantes de fHBP, uma da subfamília A e outra da B (A05 e B01, respectivamente), usa fosfato de alumínio como adjuvante e é aplicada por via intramuscular.

O uso de OMVs é apontado em revisão atual de Acevedo et al. (2014) como estratégia viável no desenvolvimento de uma vacina contra *N. meningitidis* e também como “a interface entre os métodos novos e tradicionais de produção de vacinas”. A vacina MeNZB,

feita com OMVs de uma cepa epidêmica utilizada na Nova Zelândia apresentou evidências de reatividade cruzada contra cepas não epidêmicas e outros sorogrupos (ARNOLD et al., 2011). A vacina Bexsero, por exemplo, é composta por proteínas recombinantes (NHBA, NadA e fHbp) e OMVs de *N. meningitidis* B cepa NZ98/254 com hidróxido de alumínio como adjuvante.

Os novos avanços em vacinas para *N. meningitidis*, notavelmente a inclusão do sorogrupo B, levam a novas discussões nas possibilidades e políticas de imunização (BLACK et al., 2012; GASPARINI et al., 2014).

1.3 ADJUVANTES

Adjuvantes são definidos como componentes estruturalmente heterogênicos, utilizados para se conseguir um aumento da resposta imunológica para um antígeno (PETROVSKY; AGUILAR, 2004; STORNI et al., 2005).

A aplicação de adjuvantes não é uma prática recente (RAMON et al.,* apud PETROVSKY; AGUILAR, 2004), mas atualmente está em franco crescimento e desenvolvimento graças ao melhoramento do conhecimento biotecnológico.

Novas vacinas com patógenos mortos ou apenas componentes deles, naturais ou sintéticos, muitas vezes resultado de várias etapas de purificação, necessitam de adjuvantes para amplificar seu poder imunogênico, bem como reduzir a quantidade de antígeno ou de imunizações. Novas tecnologias em adjuvantes não só permitem a amplificação como também a modulação da resposta imune, propiciando assim maior especificidade a um dado antígeno, aprimorando a resposta em neonatos, adultos não jovens ou imunocomprometidos. Além disso, também são sistema de entrega de antígenos em mucosa (PETROVSKY; AGUILAR, 2004) e podem amenizar a competição entre os diferentes antígenos em vacinas combinadas (MOTA et al., 2006)

Um adjuvante ideal dever ter longa estabilidade pós-produção, biodegradabilidade, baixo custo, não induzir resposta imune e modular uma resposta imune apropriada ao patógeno em questão (celular e/ou humoral) (EDELMAN, 1980). Vacinas acelulares ou subunidades representam um desafio como a indução e maturação de células dendríticas (DCs).

* RAMON, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiptérique. **Bull. Soc. Centr. Med. Vet**, v. 101, p. 227–34, 1925.

RAMON, G. Procèdes pour accroître la production des antitoxines. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 40, p. 1–10, 1926

Cada adjuvante possui um modo de ação (sistemas de entrega, imunoestimulatórios, ativadores de membrana, modo misto de ação) e dependendo dele uma resposta imunológica do tipo Th1/Th2 ou das duas delas (Fig.8). Essas características foram levantadas de diferentes trabalhos por Heegaard et al. (2011) e Wilson-Welder et al. (2009).

Quadro 1 - Isótipos de imunoglobulinas induzidas em animais de laboratório pela administração de imunógenos em diversos adjuvantes.

Adjuvante	Exemplos	Características básicas	Isótipo de anticorpo dominante
Sais Inorgânicos	Hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e fosfato de cálcio	Emulsão de hidrogel - cria efeito de depósito, melhora a maturação de macrófagos	IgG1, IgE
Emulsões oleosas	Óleo mineral	Emulsão base de água em óleo com registro de longa data como padrão ouro em pesquisa	IgG1
	MF59	Mistura de muramiltipeptídeo, esqualeno, poli oxietileno, monoelatosorbitano etrioleatosorbitano	IgG2a
	QS-21	Saponina purificada a partir de <i>Quillaja saponica</i> , usada para emulsões lipídicas estabilizadas	IgG2a
	Montamide ISA-51 e ISA-720	Óleo comercial para emulsão de água em óleo	IgG1
Isocoms	ISCOMATRIX	Complexo de saponinas e lipídios	IgG1
Derivado microbiano	Monofosforil lipídio A (MPLA)	Ligante de TLR-4 detoxificado	IgG1 e IgG2a/c
	Macrófago de ativação da proteína-2	Ligante de TLR-2 de <i>Mycoplasma spp</i> e derivados purificados	IgG2a
	Virossomos	Complexos lipídicos estabilizados contendo proteínas virais tais como a hemaglutinina da influenza	IgG2a, IgA
	LT/CT	Toxinas bacterianas modificadas para aderência em mucosa, enterotoxina sensível ao calor e toxina da cólera	LT: IgG1, IgG2a e IgA

	CpG	DNA bacteriano não metilado, um TLR-9 ligante	IgG2a
Citocinas como adjuvantes	IL-1	Citocina pró-inflamatória	IgG2a, IgA
	IL-2	Citocina linfo proliferativa	IgG2a
	IL-12	Citocina pró-inflamatória	IgG2a, IgA
	IL-6	Citocina anti-inflamatória	IgG1, IgA
Polímeros naturais	Polissacarídeos	Revestimento ou emulsionado com antígeno sólido	IgG1 ou IgA dependendo da rota
Polímeros sintéticos	Polianidridos	Antígeno e imunoestimuladores emulsionados em partículas biodegradáveis que variam de 50 µm a 20 nm	Variável de acordo com a inclusão de imunoestimulantes e química de polímeros
	Poliésteres	Antígeno e imunoestimuladores emulsionados em partículas biodegradáveis que variam de 50 µm a 20 nm	Variável de acordo com a inclusão de imunoestimulantes e antígeno incorporado

Fonte: Adaptada de Wilson-Welder et al., 2009.

Atualmente, os adjuvantes licenciados para uso em humanos são apenas 5, com predomínio de uso do de sais de alumínio, como fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio. Diversos adjuvantes estão em testes já em humanos, incluindo DDA (Fig. 9).

Quadro 2 - Adjuvantes licenciados e em teste para uso em humanos. Observar que a classe de lipossomos já tem um adjuvante comercial para humanos e que o dimetildioctadecilamônio é um dos componentes do adjuvante CAF01, testado em humanos, mas ainda não licenciado.

Nome do adjuvante licenciado	Classe do adjuvante	Componentes	Vacinas (doença)
Adjuvantes licenciados para uso em vacinas humanas			
Alumínio* (1924)	Sais minerais	Fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio	Várias
MF59 (Novartis: 1997)	Emulsão de óleo em água	Esqualeno, polissorbato 80 (Tween 80: ICI Americas), trioleato de sorbitano (Span 85: Croda Internacional)	Fluad (influenza sazonal), Focetria (pandemia de influenza), Aflunov (influenza pré-pandêmica)
AS03 (GlaxoSmithKline: 2009)	Emulsão de óleo em água	Esqualeno, Tween 80, α -tocoferol	Pandremix (pandemia de gripe), Prepandrix (influenza pré-pandêmica)
Virossomos (Berna Biotech: 2000)	Lipossomos	Lipídios, hemaglutinina	Inflexal (influenza sazonal), Epaxal (hepatite A)
AS04* (GlaxoSmithKline: 2005)	Agonista de TLR4 Alumínio-absorvido	Hidróxido de alumínio, MPL	Fendrix (hepatite B), Cervarix (papiloma vírus humano)
Adjuvantes de vacinas testadas em seres humanos, mas não licenciados para utilização			
CpG 7909, CpG 1018	TLR9 agonista	Oligonucleotídeos CpG sozinhos ou combinados com alumínio/emulsões	-
Imidazoquinolinas	TLR7 e TLR8 agonistas	Pequenas moléculas	-
Polyl:C	TLR3 agonista	Análogos de RNA de cadeia dupla	-
Pam3Cys	TLR2 agonista	Lipopeptídeo	-
Flagelinas	TLR5 agonista	Proteína bacteriana ligada ao antígeno	-
Iscomatrix	Combinação	Saponina, colesterol, dipalmitoilfosfatidilcolina	-

AS01	Combinação	Lipossomo, MPL, saponina (QS21)	-
AS02	Combinação	Emulsão de água em óleo, MPL, saponina (QS21)	-
AF03	Emulsão de água em óleo	Esqualeno, Montane 80, Eumulgin B1 PH	-
CAF01	Combinação	Lipossomo, DDA, TDB	-
IC31	Combinação	Oligonucleotídeo, peptídeos catiônicos	-

AF03, formulação 03 de adjuvante; CAF01, formulação de adjuvante catiônico 01; DDA, dimetildiocetadecilamônio; MPL, monofosforil lipídeo A; Pam3Cys, tripalmitoil-S-gliceril cisteína; PolyI:C, ácido policitidil polinosínico; TDB, trealose idibehenato; TLR, *Toll-like receptor*.
*Adjuvantes licenciados nos Estados Unidos.

Fonte: RAPUOLLI et al., 2011

Outros adjuvantes ainda experimentais, mas muito interessantes são a sílica mesoporosa (MERCURI et al., 2006) e os esporos bacterianos (DE SOUZA et al., 2014; TAVARES BATISTA et al., 2014).

A sílica mesoporosa ordenada (SBA-15) como adjuvante teve seu primeiro relato em 2006 (MERCURI et al., 2006), quando induziu resposta igual ou superior à obtida com uso do Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) na imunização de camundongos BALB/c contra proteína recombinante de *E. coli* (*Int1β*) ou complexo protéico de veneno de *Micrurus ibiboca*. Os autores discutem a possibilidade de o efeito tóxico da sílica sobre os macrófagos prevenir sua atividade catabólica sobre o antígeno, modulando a resposta para que células dendríticas e B possam apresentar os antígenos ao invés dos macrófagos, ampliando a imunogenicidade, uma vez que essas células atuam mais eficazmente do que os macrófagos na memória imunológica.

Lipossomas catiônicos estão em estudo para uso na transfecção não viral de pDNA (DNA plasmidial). Embora ainda não completamente elucidadas, as interações entre o material biológico e o adjuvante são fortemente influenciados por suas cargas (BALBINO et al., 2012). Esse grupo já vem testando estratégias em microfluídica para aprimorar a produção dos complexos com maior reprodutibilidade, visando também maior rendimento, essencial para que esse sistema de entrega possa depois ser aplicado em terapia gênica e vacinas de DNA (BALBINO et al., 2013).

Recentemente, Ferreira e De Gaspari (2012) testaram em modelo experimental as toxinas Stx1 e Stx2 detoxificadas de Shiga (toxóides de *E. coli*) como adjuvantes em preparação antigênica de OMPs de *N. meningitidis* B. A imunização nasal em camundongos

neonatos em sistema de sensibilização inicial e reforço- *prime-booster* -de quatro imunizações intranasais no período de doze dias promoveu resposta humoral sistêmica e de mucosa.

O adjuvante de Freund completo (FCA) foi inicialmente utilizado em estudos na imunização de camundongos que levou à identificação de 28 antígenos de *N. meningitidis*, os quais foram avaliados para posterior produção de vacinologia reversa (GIULIANI et al., 2006). Os autores sugeriam o uso dos adjuvantes CpG ou MF59 ou dose extra para aprimorar a resposta imune em humanos, hoje, ao final do desenvolvimento, a vacina Bexsero usa como adjuvante o hidróxido de alumínio (EMA, 2012).

1.3.1 HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO

O adjuvante mais antigo e utilizado em humanos desde 1932, é modulador de respostas do tipo Th2, ampliando fortemente a imunidade humoral. A falta de resposta Th1, mediada por células é o principal fator para a busca por novos adjuvantes (MARRACK et al., 2009).

Mesmo sendo largamente utilizado, seu modo de ação ainda vem sendo estudado mais minuciosamente (BREWER, 2006; KOOL et al., 2008) e frequentemente revisado (LINDBLAD, 2004; TERHUNE; DETH, 2014). Novos usos são propostos, como combinações com nanopartículas (BANSAL et al., 2014). Críticas sobre toxicidade e acúmulo são feitas (KRAMER; HEATH, 2014).

1.3.2 BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO (DDA) EM FRAGMENTOS DE BICAMADA (BF)

A auto associação de lipídeos catiônicos em dispersões aquosas pode resultar em bicamadas fechadas como vesículas ou lipossomos (CARMONA-RIBEIRO, 2010), com a vantagem adicional de permitir adsorção, por atração eletrostática, de uma ampla variedade de biomoléculas ou estruturas biológicas, em sua maioria, negativamente carregadas. Vesículas fechadas ou fragmentos de bicamadas podem ser obtidos segundo o método de preparação (CARMONA-RIBEIRO, 2001). Como imunoadjuvante, a principal vantagem de usar fragmentos de bicamada, é a baixa concentração de lipíde necessária para atingir o efeito desejado, rápida formulação e baixo custo.

Recentemente novos adjuvantes baseados em fragmentos de bicamada de DDA ou partículas biomiméticas de DDA têm sido avaliados com sucesso (LINCOPAN et al., 2007; LINCOPAN et al., 2009a,b; LINCOPAN; CARMONA-RIBEIRO, 2009).

Inicialmente utilizado como sistema de entrega de antibiótico (LINCOPAN et al., 2003), o DDA-BF logo encontrou um grande campo enquanto adjuvante no desenvolvimento vacinal (GASPAR et al., 2013; LINCOPAN et al., 2009; RINALDI, 2014).

Esse adjuvante recentemente foi testado em nossos estudos com *Neisseria lactamica* (GASPAR et al., 2013) e com *Neisseria meningitidis* (RINALDI, 2014). O uso desse adjuvante com *N. meningitidis* para imunização subcutânea induziu a produção de isótipos IgG2a e IgG2b, mas não de IgG1, enquanto o uso de hidróxido de alumínio produziu os três tipos. No estudo de resposta cruzada, o uso de DDA-BF com OMVs induziu soros murinos capazes de reconhecer 88% (frente a apenas 30% dos induzidos por HA/OMVs) de 119 cepas isoladas de pacientes com doença meningocócica nos anos de 2011/2012.

O uso de DDA aniônico com CpG induziu a produção de anticorpos do tipo IgG2a contra OVA com títulos maiores do que animais imunizados apenas de DDA e OVA (ROZENFELD et al., 2012).

O DDA também é um dos componentes do CAF01, adjuvante em fase de estudos pré-clínicos que vem obtendo um padrão misto de resposta (humoral e celular) em vacinas experimentais para micobactérias (AGGER et al., 2008), clamídia (OLSEN et al., 2010) e influenza (ROSENKRANDS et al., 2011). Nesse adjuvante, há o uso de solvente orgânico (clorofórmio e metanol) que depois é retirado e a hidratação do filme é feita em tampão TRIS. Dietrich e colaboradores (2014) obtiveram uma formulação estável desse adjuvante com o vírus da poliomielite inativado, promovendo rapidamente forte imunidade protetora em camundongos, incluindo a tão desejada imunidade intestinal. Com resultados tão promissores, o grupo segue para ensaios clínicos.

1.4 VIAS DE IMUNIZAÇÃO UTILIZADAS

As principais vias vacinais são: oral (Sabin contra poliomielite, contra febre tifoide), intradérmica (BCG), subcutânea (sarampo, caxumba, rubéola, varicela e febre amarela), intramuscular (vacinas usualmente dolorosas, como DTP, dT, DTPa (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE- FUNASA, 2001; VILARINO, 2009).

A escolha da via depende da preparação antigênica utilizada. A oral é indicada para substâncias facilmente absorvidas no trato gastrointestinal, a intradérmica para absorção muito

lenta, a via subcutânea para soluções não irritantes, de absorção lenta e ação contínua; a via intramuscular para soluções irritantes (aquosas ou oleosas) e/ou quando há necessidade de rápida absorção (FUNASA, 2001). A aplicação intravenosa é utilizada para outros imunobiológicos, como soros antiofídicos, mas atualmente não para vacinas (FUNASA, 2001; VILARINO, 2009), embora esteja em testes clínicos uma vacina contra malária de administração intravenosa (SEDER et al., 2013).

O manuseio e aplicação da vacina também são componentes para eficácia e segurança. Dentre as vacinas, as vias mais utilizadas são intramusculares e subcutâneas. A aplicação por vias injetáveis exige cuidados extras para evitar contaminação, como no caso de frascos multidoses (VILARINO, 2009).

No contexto da aplicação de vacinas, a via intramuscular é a que requer mais cuidados. A aplicação dessa via foi revisada por Small (2004), visto as várias complicações possíveis (abscesso, celulite, necrose tecidual, granuloma, fibrose muscular e contratura, injeção intravascular, hematoma e dano aos vasos sanguíneos, ossos e nervos periféricos), em especial com relação aos danos ao nervo ciático quando na região glúteo-dorsal. A autora coloca que essas complicações são possíveis de evitar por treinamento adequado do aplicador, sendo preferível a região glúteo-ventral para aplicação.

O uso das vias pode favorecer a imunização de tal modo que a quantidade de antígeno necessária seja reduzida (HICKLING et al., 2011). Essa economia de dose é de grande interesse, pois em efeito cascata gera economia de antígeno, aplicações, divulgação, reduz desistência de doses posteriores e economia de tempo e dinheiro.

A região da derme e epiderme, rica em células apresentadoras de antígenos, é o alvo da vacinação intradérmica. Essa via, um pouco acima dos vasos sanguíneos que ficam logo acima da região de aplicação subcutânea, vem ganhando espaço e demonstrou ser tão eficaz quanto a intramuscular na resposta humoral, com a vantagem de usar apenas 1/5 da dose utilizada na via intramuscular em vacina contra raiva (NICOLAS; GUY, 2008).

1.5 LINHAGENS DE CAMUNDONGOS

Geneticamente, as colônias de animais podem ser classificadas como *inbred* ou *outbred*. Os animais heterogênicos, heterocruzados, heterogâmicos de colônias *outbred*, também chamadas de não-isogênicas, não consanguíneos, ou *outbred* apresentam grande variabilidade genética por serem provenientes de acasalamentos ao acaso (FERREIRA et al. 2005; SOARES et al., 2001).

Os animais consanguíneos, endocruzados, isogênicos, isogâmicos ou *inbred*) oferecem fixação de algumas características genéticas, visto que resultam de acasalamentos entre irmãos, por pelo menos 20 gerações (FERREIRA et al., 2005; SOARES et al., 2001).

Não há modelo animal natural para *N. meningitidis*. O modelo animal induzido para estudo de *Neisseria meningitidis* B foi estabelecido em camundongos C57BL/6 (BRODEUR et al., 1986). Foi demonstrado que o aumento da virulência bacteriana pela adição de 4% de mucina e 1,6% de hemoglobina aumenta a infectividade dos animais pela bactéria. Esse tipo de procedimento possibilita estudos de bacteremia, nos quais é feita a cultura do sangue e de ensaios de desafio letal para avaliação de novas vacinas.

O antigo item das pesquisas “material biológico” hoje dá lugar ao termo “reagentes biológicos”, visto sua grande influência nos resultados dos experimentos. Tal como um reagente químico, consideram-se várias características, classificadas em condição sanitária, genotípica e como modelo experimental (FERREIRA et al., 2005).

Biologicamente desenvolvidas, novas e diversas linhagens de camundongos estão disponíveis para pesquisa, totalizando mais de 2.000 linhagens de camundongos (SOARES et al., 2001). Linhagens de camundongos geneticamente padronizados contribuíram enormemente para os avanços nas áreas de genética, câncer, transplantes e imunologia. (SOARES et al., 2001)

O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) foi descoberto em experimentos com linhagens isogênicas de camundongos e tem seus genes no cromossomo 17, sendo chamado de H-2 nos camundongos. Os genes do MHC de classe I são chamados de *H-2K*, *H-2D* e *H-2L*, enquanto os de classe II são *H2-A* e *E* no camundongo (MURPHY et al., 2010).

A capacidade de resistência ou sobrevivência do hospedeiro contra mecanismos de virulência e evasão de patógenos estão ligadas ao MHC, pois suas moléculas são provenientes de polimorfismos e poligenismos genéticos e são elas que apresentam os antígenos às células T pela interação com os TCR. Ou seja, cada indivíduo apresenta mais de um tipo de molécula de MHC e é muito ampla a diversidade de moléculas de MHC entre os indivíduos, o que se reflete na resposta imunológica individualmente. Essa diversidade toda é consequência da evolução do MHC contra a evasão de patógenos (MURPHY et al., 2010).

A importância do camundongo na modelagem de doenças humanas se materializa em inúmeros mutantes murinos espontâneos e induzidos que são constantemente recuperados pelos geneticistas de camundongos. A coleção atual de mutações cobre alterações em praticamente todas as classes fenotípicas. Um grande número de mutantes

apresenta fenótipos homólogos aos observados em doenças humanas , que em grande parte dos casos se estendem a nível molecular (GUÉNET, 2011).

Um benefício adicional do camundongo como organismo modelo é a habilidade de se controlar a sua genética. Existe uma ampla variedade de linhagens isogênicas de camundongos disponíveis que podem ser controladas geneticamente. Além disso seus embriões podem ser manipulados permitindo uma super expressão ou expressão reduzida de alguns genes através por meio da produção de camundongos transgênicos e camundongos knock-out”.

A não uniformidade genética é uma escolha neste trabalho, com linhagens não isogênicas, visando uma resposta do tipo populacional, e isogênicas, visando o estudo da resposta individual, mais semelhante ao padrão diversificado de características apresentado pela população humana, sendo assim mais reprodutivo da realidade.

Andrade e colaboradores (1985) utilizaram diferentes linhagens de isogênicos para avaliar aspectos imunológicos em relação à infecção por *T. cruzi*, pois há heterogeneidade entre essas linhagens. A linhagem de camundongos BALB/c, por exemplo, é conhecida por apresentar um perfil de citocinas de padrão Th2, enquanto a C57Bl/6J de padrão Th1, dependendo do antígeno e da via de imunização.

Como modelo experimental para leishmaniose cutânea, a linhagem A/J foi utilizada como resistente, enquanto BALB/c como susceptível. A atividade fagocitária de leucócitos polimorfonucleares em leishmanias e a ocorrência de necrose foram os principais aspectos da reação de hipersensibilidade tardia nesses animais (ANDRADE et al., 1984).

A linhagem BALB/c é muito comum em experimentos que utilizam o padrão de citocinas Th2, a C57Bl/6J tem como perfil o padrão Th1, a A/J tem haplótipo H2a.

Quadro 3- Breve comparação entre linhagens

Swiss	BALB/c	C57BL/6
Geralmente responde com altos títulos e diferentes subclasses de imunoglobulinas	Particularmente bem conhecidos na produção de plasmocitomas após injeção com óleo mineral, formando a base para a produção de anticorpos monoclonais	Aumento da resposta inflamatória
Extensas variações alélicas estimadas em 46 <i>locus</i> genéticos dentro das três principais colônias <i>Swiss</i> de linhagens consanguíneas ou derivativas. ICR	Haplótipo H2^d	Haplótipo H2^b

Fonte: Elaborado pela autora.

Como já observado por Gorla (2003) quando utilizou as linhagens isogênicas BALB/c, geneticamente heterogêneas Swiss e geneticamente selecionadas “*high*” e “*low*”, comparando as diferentes linhagens representando boa ou má resposta, os indivíduos ou populações de acordo com suas características genéticas, podem contribuir na compreensão da resposta imune às vacinas em populações humanas, visto que os indivíduos apresentam heterogeneidade entre si na produção de anticorpos.

Camundongos transgênicos com o gene CEACAM1 humano podem ser colonizados por meningococos. Pajon e colaboradores (2015) utilizaram desses camundongos humanizados para testar vacinas baseadas em OMVs e provar sua capacidade de reduzir a colonização. Os animais foram imunizados intraperitonealmente com NOMVs mutantes, as quais apresentavam endotoxinas atenuadas e super-expressão de proteínas de ligação fator H da subfamília B (FHbp).

Apesar dos inúmeros estudos realizados, ainda há a necessidade de desenvolver e aprimorar as vacinas para crianças, o que exige a compreensão das vias envolvidas na imunidade a diversos patógenos. Os avanços científicos levaram a produção de muitos dados que estão em uso para encontrar genes que regulam as respostas a vacinas, como a persistência da resposta imune (NEWPORT, 2015). São de grande repercussão os trabalhos na área de Sistemas de Vacinologia, os quais possibilitaram análises preditivas sobre vacinas (PULENDRAN et al., 2010; QUEREC et al., 2009).

1.6 JUSTIFICATIVAS DO PROJETO

Entender a imunidade protetora é uma das chaves necessárias para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a *N. meningitidis* que afeta principalmente crianças e jovens. Diversos estudos têm demonstrado que esta proteção está associada com estruturas do meningococo e com antígenos de reatividade cruzada capazes de induzir proteção de anticorpos bactericidas e de alta avidéz. Lembrando também que a escolha do adjuvante é de fundamental importância.

Estudos sugerem que as determinações sobre a eficácia dos esquemas de vacinação na indução de respostas protetoras necessitam de estudos mais abrangentes, incluindo aspectos como a influência do intervalo de tempo entre doses administradas e influência na resposta imunológica e avaliações em diferentes populações .

A defesa do hospedeiro contra infecções bem como a indução de proteção através de vacinas, dependem de mecanismos específicos não específicos, em sua grande maioria,

determinados geneticamente. Outros fatores relevantes são a estrutura química e o estado físico dos antígenos constitutivos de imunógenos e patógenos. Os aspectos operacionais do sistema imune são também afetados por fatores ambientais, em especial as experiências prévias dos indivíduos que vivem em áreas onde observamos a presença do microrganismo ou antígenos administrados pelas vacinações. Assim, numa população geneticamente heterogênea, grupos de indivíduos submetidos ao mesmo estímulo imunogênico, apresentarão distintas respostas inflamatórias e imunoadaptativas.

6 CONCLUSÕES

ELISA SWISS

- Aos 15 dias de imunização, apenas os grupos imunizados com OMVs DDA IP, OMVs HA IP e OMVs HA IM produziram IgG2a. Aos 66 dias de imunização, já com 2 doses, ambos adjuvantes levaram à produção de imunoglobulinas IgG2a, diferindo entre as vias. A via subcutânea foi a maior indutora da resposta, seguida pela intramuscular e, por último, a via intraperitoneal.

AVIDEZ SWISS

Todos os grupos experimentais apresentaram altos índices de avides de anticorpos IgG, sendo os valores mais altos produzidos pelos grupos que utilizaram HA como adjuvante (OMVs HA SC, OMVs HA IP, OMVs HA IM) seguidos pelos grupos de DDA (OMVs DDA IM, OMVs DDA SC, OMVs DDA IP).

HISTOPATOLOGIA SWISS

- Nas patas desafiadas, há o predomínio de infiltrado inflamatório, diferindo na intensidade e tipo celular entre as doses: após 1 dose, infiltrado inflamatório de moderado a intenso constituído predominantemente por neutrófilos e raros plasmócitos e macrófagos, enquanto após 2 doses foi verificado predomínio de infiltrado inflamatório de leve a moderado com presença de linfócitos.

HTT Swiss

Houve uma diferença quando comparado as diferentes vias de imunização tanto com DDA-BF como com o adjuvante HA

HTT ISOGÊNICOS

Não houve diferença significativa.

ELISA ISOGENICOS

- Na linhagem BALB/c, ambos adjuvantes não amplificaram a resposta imune produtora de IgG, enquanto em C57BL/6, apenas o adjuvante HA amplificou a resposta imune produtora de IgG.
- A linhagem C57BL/6 respondeu muito pouco e bem menos do que BALB/c na produção de IgG.
- Não houve amplificação da resposta imune produtora de IgG1 em BALB/c
- Ao contrário de BALB/c, a linhagem C57BL/6 teve resposta bem baixa para imunização apenas com OMVs aos 15 dias para produção de IgG1 e amplificação da resposta com o uso de OMVs HÁ.
- Não houve amplificação da resposta imune produtora de IgG2a nem em BALB/c nem em C57BL/6

AVIDEZ

- A avaliação do índice de avides nas linhagens BALB/c e C57BL/6 demonstrou altos índices de avides dos anticorpos anti-IgG produzidos após 15 e 70 dias em todos os grupos imunizados com adjuvante e OMVs, enquanto a maioria dos controles teve baixos índices.

REFERÊNCIAS*

- ACEVEDO, R.; FERNÁNDEZ, S.; ZAYAS, C.; ACOSTA, A.; SARMIENTO, M. E.; FERRO, V. A.; ROSENQVIST, E.; CAMPA, C.; CARDOSO, D.; GARCIA, L.; PEREZ, J. L. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 121, 2014.
- AGGER, E. M.; ROSENKRANDS, I.; HANSEN, J.; BRAHIMI, K.; VANDAHN, B. S.; AAGAARD, C.; WERNINGHAUS, K.; KIRSCHNING, C.; LANG, R.; CHRISTENSEN, D.; THEISEN, M.; FOLLMANN, F.; ANDERSEN, P. Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3116, 2008.
- AMBROSINO, D. M.; WANG, M.; CIAMARRA, A.; CHAN, M.; BOLON, D. L.; MINN, J.; JACOBSON, D. A.; FINBERG, R. W. T cells and natural killer cells regulate human IgG subclass concentrations in SCID mice. **Cell. Immunol.**, v. 155, p. 134-143, 1994.
- ANDRADE, Z. A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B.; SADIGURSKY, M. Patogenia da leishmaniose cutânea experimental. a importância da necrose na eliminação dos parasitos das lesões. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, p. 187-197, 1984.
- ANDRADE, V.; ANDRADE, S. G.; NETTO, M. B.; PONTES, A. L.; CASTRO, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 143-154, 1985.
- ANDREWS, S. M.; POLLARD, A. J. A vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis*: dealing with uncertainty. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 426-434, 2014.
- ARNOLD, R.; GALLOWAY, Y.; MCNICHOLAS, A.; O'HALLAHAN, J. Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand. **Vaccine**, v. 29, p. 7100- 7106, 2011.
- BALBINO, T. A.; GASPERINI, A. A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; AZZONI, A. R.; CAVALCANTI, L. P.; DE LA TORRE, L. G. Correlation of the Physicochemical and Structural Properties of pDNA/Cationic Liposome Complexes with Their in Vitro Transfection. **Langmuir**, v. 28, p. 11535-11545, 2012.
- BALBINO, T. A.; AZZONI, A. R.; DE LA TORRE, L. G. Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 111, p. 203-210, 2013.
- BANSAL, V.; KUMAR, M.; DALELA, M.; BRAHMNE, H. G.; SINGH, H. Evaluation of synergistic effect of biodegradable polymeric nanoparticles and aluminum based adjuvant for improving vaccine efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 377-384, 2014.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BENAVIDES, F. F.; GLÈNET, J. L. **Manual de genética de roedores de laboratório: princípios básicos y aplicaciones**. Madrid: Universidad de Alcalá, 2004. p.312.

BEERETZ, I.; SNAPE, M.D.; FINN, A.; HEATH, P.; COLLINSON, A.; BONA, G. Reactogenicity and safety of multicomponent Meningococcal Serogroup B Vaccine (4CMenB) administered with or without routine infant vaccinations in different schedules. In: EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES CONFERENCE, 29., June 7-11, 2011. **Anais...** The Hague, The Netherlands, 2011.

BERRY, D. S.; LYNN, F.; LEE, C.; FRASCH, C. E.; BASH, M. C. Effect of O Acetylation of *Neisseria meningitidis* Serogroup A Capsular Polysaccharide on Development of Functional Immune Responses. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3707-3713, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **A história da vacinação**. 1998. Disponível em <http://189.28.128.179:8080/svs_informa/edicao especial-imunizacoes/linha-do-tempo> Acesso em: 19 nov. 2012.

BREWER, J. M.. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunology Letters**, n. 102, p. 10-15, 2006.

BRODEUR, B. R.; TSANG, P. S.; HAMEL, J.; LAROSE, Y.; MONTPLAISIR, S. Mouse models of infection for *Neisseria meningitidis* B,2b and *Haemophilus influenzae* type b diseases. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, n.1, p. 33-37, 1986.

CARMO, A. M. S.; FERRAZ, A. S ; ITO, A. Y ; NERI, S. V ; CUNHA, T. N.; DE GASPARI, E. N. Prime-Bo]ost Immunogenicity of Class 5C Protein from *Neisseria meningitidis* in Mice with Different Adjuvants. **The Open Vaccine Journal**, v. 2, p. 45-55, 2009.

CARMONA RIBEIRO, A. M. Lipid bilayer fragments in disks in drug delivery. **Current Medicine Chemistry**, v. 13, p. 1359-1370, 2006.

CARMONA RIBEIRO, A. M. **Cationic nanostructures for vaccines, immune response activation**. Dr. Ht Duc (Ed.). InTech, 2014. ISBN: 978-953-51-1374-4. doi: 10.5772/57543. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/immune-response-activation/cationic-nanostructures-for-vaccines>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

CARMONA-RIBEIRO, A. M. Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, n. 5, p. 249-259, 2010.

CEESAY, S. J.; ALLEN, S. J.; MENON, A.; TODD, J. E.; CHAM, K.; CARLONE, G. M. et al. Decline in meningococcal antibody levels in African children 5 years after vaccination and the lack of an effect of booster immunization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 1212-1216, 1993.

CHACKERIAN, B.; LOWRY, D. R.; SCHILLER, J. T. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 415-423, 2001.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Gráficos de Doença Meningocócica** – Estado de São Paulo. Disponível em:

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/meni_dados.html> Acesso em: 24 maio 2015.

DAVIDSEN, J.; ROSENKRANDS, I.; CHRISTENSEN, D.; VANGALA, A.; KIRBY, D.; PERRIE, Y.; AGGER, E. M.; ANDERSEN, P. Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate) – a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. **Biochemical Biochimic Acta**, v. 1718, p. 22-31, 2005.

DE GASPARI, E.; ZOLLINGER, W. D. Expression of Class 5 Antigens by Meningococcal Strains Obtained From Patients in Brazil and Evaluation of Two New Monoclonal Antibodies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 143-153, 2001.

DE SOUZA, R. D.; BATISTA, M. T.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C.; AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S.; MARTINS, E. G.; FERREIRA, L. C. *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87454-e87454, 2014.

DIETRICH, J.; ANDREASEN, L.V.; ANDERSEN, P.; AGGER, E.M.. Inducing Dose Sparing with Inactivated Polio Virus Formulated in Adjuvant CAF01. **PLoS One**, v.9, n.6, p.e100879, 2014.

DIAKUN, K. R.; MARTIN, D. C.; MININNI, T.; SKUSE, J.; ZIEMBIEC, N.; QUATAERT, S. Immunoassay of human *Neisseria meningitidis* serogroup A antibody. **Immunological Investigation**, v. 26, p. 661-679, 1997.

EDELMAN, R. Vaccine Adjuvants. **Review of Infectious. Diseases**, v. 2, p. 370-383, 1980.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Assessment report Bexsero**. 15 November 2012 EMA/790069/2012 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002333/WC500137883.pdf> Acesso em: 3 out. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Highlights of prescribing information trumenba** (Meningococcal Group B Vaccine). 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM421139.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 14.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Experimental models in research. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, p.28-34, 2005. Supl. 2.

FERREIRA, T.; DE GASPARI, E. The design of new adjuvants for mucosal immunity to *Neisseria meningitidis* B in nasally primed neonatal mice for adult immune response. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 14 p., 2012.

FRASCH, C. E.; ZOLLINGER, W. D.; POOLMAN, J. T. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. **Review of Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 1985.

FRASCH, C. E. Vaccines for prevention of meningococcal disease. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 2, p. 134-138, 1989.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE- FUNASA. Manual de Procedimentos para Vacinação. ago. 2001. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_proced_vac.pdf>. Acesso em 11 out 2014.

GASPAR, E. B.; ROSETTI, A. S.; LINCOPAN, N.; DE GASPARI, E. *Neisseria lactamica* antigens complexed with a novel cationic adjuvant. **Hum. Vaccin. Immunother.**, v. 9, n. 3, p. 572-581, 2013.

GASPARINI, R.; AMICIZIA, D.; DOMNICH, A.; LAI, P. L.; PANATTO, D. *Neisseria meningitidis* B vaccines: recent advances and possible immunization policies. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 13, n. 3, p. 345-364, 2014.

GIULIANI, M. M.; ADU-BOBIE, J.; COMANDUCCI, M.; ARICÒ, B.; SAVINO, S.; SANTINI, L.; BRUNELLI, B.; BAMBINI, S.; BIOLCHI, A.; CAPECCHI, B.; CARTOCCI, E.; CIUCCHI, L.; DI MARCELLO, F.; FERLICCA, F.; GALLI, B.; LUZZI, E.; MASIGNANI, V.; SERRUTO, D.; VEGGI, D.; CONTORNI, M.; MORANDI, M.; BARTALESI, A.; CINOTTI, V.; MANNUCCI, D.; TITTA, F.; OVIDI, E.; WELSCH, J.A.; GRANOFF, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 29, p. 10834–10839, 2006.

GONÇALVES, P. C. Z.; DRIESSEN, A. L.; ROSÁRIO, B.; HORTA, B. R.; SUTTILE, F. P.; WROBLEVSKI, F. C. Perfil epidemiológico das meningites meningocócicas nos últimos 11 anos em Curitiba-PR. **Rev. Med. Res.**, v.16, n.2, p.113-121, 2014.

GORLA, M. C. O. **Resposta Imune a uma vacina protéica antimeningocócica B**: estudo da influência de intervalos de tempo entre as imunizações. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2003.

GOSSGER, N.; SNAPE, M. D.; YU, L.; FINN, A.; BONA, G.; ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N.; DIEZ-DOMINGO, J.; SOKAL, E.; BECKER, B.; KIENINGER, D.; PRYMULA, R.; DULL, P.; YPMA, E.; TONEATTO, D.; KIMURA, A.; POLLARD, A.J. Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules – a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 307, n. 6, p. 573-582, 2012.

GRANOFF, D. M.; FORREST, B.; RAPPUOLI, R. Meningococcal polysaccharide- protein conjugate vaccines. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 1, p. 152-157, 1997.

GRANOFF, D. M.; BARTOLONI, A.; RICCI, S. Bactericidal monoclonal antibodies that define unique meningococcal B polysaccharide epitopes that do not cross-react with human polysialic acid. **J. Immunol.**, v. 160, p. 5028-5036, 1998.

GUÉNET JL Animal models of human genetic diseases: do they need to be faithful to be useful? **Mol. Genet. Genomics**, v. 286, n. 1, p. 1-20, 2011.

HEEGAARD, P. M.; DEDIEU, L.; JOHNSON, N.; LE POTIER, M. F.; MOCKEY, M.; MUTINELLI, F.; VAHLENKAMP, T.; VASCELLARI, M.; SØRENSEN, N. S. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. **Arch. Virol.**, v. 156, n. 2, p. 183-202, 2011.

HICKLING, J. K.; JONES, K. R.; FRIEDE, M.; ZEHRUNG, D.; CHEN, D.; KRISTENSEN, D. Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. **Bull. World Health Organ.**, v. 89, n. 3, p. 221-226, 2011.

HOLST, J.; OSTER, P.; ARNOLD, R.; TATLEY, M. V.; NAESS, L. M.; AABERGE, I. S.; ALLOWAY, Y.; McNICHOLAS, A.; O'HALLAHAN, J.; ROSEQVIST, E.; BLACK, S. Vaccines against meningococcal serpgroup B disease containing outer membrane vesicles (OMVS). **Hum. Vacc. & Immunother.**, v. 9, p. 1241-1253, 2013

ITO, A.Y ; NERI, S.V ; MACHADO, M. S. S ; TUNES, C. F. ; DE GASPARI, E. N. Homologous prime-boost strategy in neonate mice using *Neisseria lactamica*. **Vaccine (Guildford)**, v. 27, p. 3422-3428, 2009.

KATZ, D.; INBAR, I.; SAMINA, I.; PELEG, B. A.; HELLER, D. E. Comparison of dimethyldioctadecylammonium bromide, Freund's complete adjuvant and mineral oil for induction of humoral antibodies, cellular immunity and resistance to Newcastle disease virus in chickens. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 7, p. 303-313, 1994.

KABA, S. A.; PRICE, A.; ZHOU, Z.; SUNDARAM, V.; SCHNAKE, P.; GOLDMAN, I. F.; LAL, A. A.; UDHAYAKUMAR, V.; TODD, C. W. Immune responses of mice with different genetic backgrounds to improved multiepitope, multitarget malaria vaccine candidate antigen FALVAC-1A. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 15, n. 11, p. 1674-1683, 2008.

KOOL, M.; PÉTRILLI, V.; DE SMEDT, T.; ROLAZ, A.; HAMMAD, H.; VAN NIMWEGEN, M.; BERGEN, I. M.; CASTILLO, R.; LAMBRECHT, B. N.; TSCHOPP, J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. **The Journal of Immunology**, n. 181, p. 3755-3759, 2008.

KRAMER, M. F.; HEATH, M. D. Aluminium in allergen-specific subcutaneous immunotherapy – A German perspective. **Vaccine**, v. 32, p. 4140-4148, 2014.

KRISTIANSEN, B. E.; TVETEN, Y.; JENKINS, A. Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of *Neisseria meningitidis*? A population based study. **BMJ**, v. 5, p. 621-625, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEPOW, M. L.; BEELER, J.; RANDOLPH, M.; SAMUELSON, J. S.; HANKINS, W. A. Reactogenicity and immunogenicity of a quadrivalent combined meningococcal polysaccharide vaccine in children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, p. 1033-1036, 1986.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 412-418, 2003.

LINCOPAN, N.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Cationic supported lipid bilayers for antigen presentation. **International Journal of Pharmacology**, v. 340, n. 1-2, p. 216-222, 2007.

LINCOPAN, N.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Protein assembly onto cationic supported bilayers. **Journal of Nanoscience Nanotechnology**, v. 9, n. 6, p. 3578-3586, 2009.

LINCOPAN, N.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; DA COSTA, M. H. B.; FAQUIM-MAURO, E.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5760-5771, 2009a.

LINCOPAN, N.; SANTANA, M. R.; FAQUIM-MAURO, E.; DA COSTA, M. H.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Silica-based cationic bilayers as immunoadjuvants. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 5, 2009b.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect. **Vaccine**, v. 22, p. 3658-3668, 2004.

MARKS, M. I.; FRASCH, C. E.; SHAPER, R. M. Meningococcal colonization and infection in children and their household contacts. **American Journal of Epidemiology**, v. 109, p. 563-571, 1979.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 287-293, 2009.

MARTINEZ, J.; PILISHVILI, T.; BARNARD, S.; CABA, J.; SPEAR, W.; ROMERO-STEINER, S.; CARLONE, G. M. Opsonophagocytosis of fluorescent polystyrene beads coupled to *Neisseria meningitidis* serogroup A, C, Y, or W135 polysaccharide correlates with serum bactericidal activity. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 9, p. 485-488, 2002.

MERCURI, L. P.; CARVALHO, L. V.; LIMA, F. A.; QUAYLE, C.; FANTINI, M. C.; TANAKA, G. S.; CABRERA, W. H.; FURTADO, M.F. D.; TAMBOURGI, D.V.; MATOS, J. R.; JARONIEC, M.; SANT'ANNA, O. A. Ordered Mesoporous Silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. **Small**, v. 2, n. 2, p. 254-256, 2006.

MASHBURN, W. L.; MCLEAN, R. J.; WHITELEY, M. Gram – negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. **Geobiology**, v. 6, p. 214-216, 2008.

MOORE, P. S.; REEVES, M. W.; SCHWARTZ, B; GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. **Lancet**, v. 2, p. 260-263, 1989.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas (Immunological adjuvants: recent advances and perspectives). **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NELSON, J. D. Jails, microbes, and the three-foot barrier. **New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 885-886, 1996.

NICOLAS, J. F.; GUY, B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. **Expert Reviews of Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 1201-1214, 2008.

NICHOLLS, E. F.; MADERA, L.; HANCOCOCK, R. E. W. Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy. **Annals New York Academy Science**, v. 1213, p. 46-61, 2010.

NOVARTIS BIOCIENTÍAS, **Vacina para prevenção de quatro sorogrupos da meningite meningocócica chega ao Brasil, 2011 – PRESS RELEASE**. Disponível em <http://www.novartis.com.br/_imprensa/releases/20111104_menveo.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2012.

NOVARTIS. **Novartis meningitis B vaccine Bexsero® receives FDA Breakthrough Therapy designation in the US**. 2014. Disponível em: <<http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2014/1774805.shtml>>. Acesso em: 3 out. 2014.

OLSEN, A. W.; THEISEN, M.; CHRISTENSEN, D.; FOLLMANN, F.; ANDERSEN, P. Protection against *Chlamydia* promoted by a subunit vaccine (CTH1) compared with a primary intranasal infection in a mouse genital challenge model. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10768, 2010.

OLIVER, J. K.; REDDIN, K. M.; BRACEGIRDLE, P.; HUDSON, M. J.; BORROW, R.; FEATHERS, I. M. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. **Infectious Immunology**, v. 70, p. 3621-3626, 2002.

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76, p. 241-251, 1994.

POLLARD, A. J.; LEVIN, M. Production of low-avidity antibody by infants after infection with serogroup B meningococci. **Lancet**, v. 356. P. 2065-2066, 2000.

PAJON, R.; BUCKWALTER, C.M.; JOHNSWICH, K.O.; GRAY-OWEN, S.D.; GRANOFF, D.M.. A native outer membrane vesicle vaccine confers protection against meningococcal colonization in human CEACAM1 transgenic mice. **Vaccine**, v. 33, n. 11, p.1317–1323, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.057>

PELTOLA, H.; MÄKELÄ, H.P.; KÄYHTY, H.; JOUSIMIES, H.; HERVA, E.; HÄLLSTRÖM, K. *et al.* Clinical efficacy of meningococcus group A capsular polysaccharide

vaccine in children three months to five years of age. **New England Journal of Medicine**, v.297, p. 686- 691, 1977.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunology Cellular Biology**, v. 82, n. 5, p. 488-96, 2004.

PULENDRAN, B.; LI, S.; NAKAYA, H.I. Systems Vaccinology. **Immunity**. v.33, n.4, p.516-529, 2010.

QUEREC, T. D.; AKONDY, R. S.; LEE, E. K.; CAO, W.; NAKAYA, H. I.; TEUWEN, D.; PIRANI, A.; GERNERT, K.; DENG, J.; MARZOLF, B.; KENNEDY, K.; WU, H.; BENNOUNA, S.; OLUOCH, H.; MILLER, J.; VENCIO, R. Z.; MULLIGAN, M.; ADEREM, A.; AHMED, R.; PULENDRAN, B. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. **Nature Immunology**, v. 10, p. 116 - 125, 2009.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. **Vaccine**, v. 19, p. 2688–2691, 2001.

RAPPUOLI, R.; MANDL, C. W.; BLACK, S.; DE GREGORIO, E. Vaccines for the twenty-first century society. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 865-872, 2011.

RINALDI, F. M. **Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado a lípide catiônico (DDA-BF)**. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROSENKRANDS, I.; VINGSBO-LUNDBERG, C.; BUNDGAARD, T. J.; LINDENSTROM, T.; ENOUF, V.; VAN DER WERF, S.; ANDERSEN, P.; AGGER, E. M. Enhanced humoral and cell-mediated immune responses after immunization with trivalent influenza vaccine adjuvanted with cationic liposomes. **Vaccine**, v. 29, p. 6283–6291, 2011.

ROSENSTEIN, N.; LEVINE, O.; TAYLOR, J. P.; EVANS, D.; PLIKAYTIS, B. D.; WENGER, J. D. et al. Efficacy of meningococcal vaccine and barriers to vaccination. **JAMA**, v. 79, p. 435-439, 1998.

ROZENFELD, J. H.; SILVA, S. R.; RANÉIA, P. A.; FAQUIM-MAURO, E.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Stable assemblies of cationic bilayer fragments and CpG oligonucleotide with enhanced immunoadjuvant activity in vivo. **Journal of Control Release**, v. 160, n. 2, p. 367-373, 2012.

ROSENQVIST, E.; HOIBY, E. A.; BJUNE, G.; AASE, A.; LEHMANN, A. K. Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. **Developmental Biology Standard**, v. 92, p. 323-333, 1998

SACCHI, C. T.; PESSOA, L. L.; RAMOS, S. R.; MILAGRES, L. G.; CAMARGO, M. C. C.; HIDALGO, N. T. R.; MELLES, C. E. A.; CAUGANT, D. A.; FRASCH, C. E. Ongoing Group B *Neisseria meningitidis* Epidemic in Sao Paulo, Brazil, Due to Increased Prevalence

of a Single Clone of the ET-5 Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1734-1738, 1992.

SEDER, R. A.; CHANG, L.; ENAMA, M. E.; ZEPHIR, K. L.; SARWAR, U. N.; GORDON, I. J.; HOLMAN, L. A.; JAMES, E. R.; BILLINGSLEY, P. F.; GUNASEKERA, A.; RICHMAN, A.; CHAKRAVARTY, S.; MANOJ, A.; VELMURUGAN, S.; LI, M.; RUBEN, A. J.; LI, T.; EAPPEN, A. G.; STAFFORD, R. E.; PLUMMER, S. H.; HENDEL, C. S.; NOVIK, L.; COSTNER, P. J. M.; MENDOZA, F. H.; SAUNDERS, J. G.; NASON, M. C.; RICHARDSON, J. H.; MURPHY, J.; DAVIDSON, S. A.; RICHIE, T. L.; SEDEGAH, M.; SUTAMIHARDJA, A.; FAHLE, G. A.; LYKE, K. E.; LAURENS, M. B.; ROEDERER, M.; TEWARI, K.; EPSTEIN, J. E.; SIM, B. K. L.; LEDGERWOOD, J. E.; GRAHAM, B. S.; HOFFMAN, S. L. VRC 312 STUDY TEAM. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1359-1365, 2013.

SINAN/ D.D.T.R./CVE - CVE- Centro de Vigilância Epidemiológica. **Gráficos de Doença Meningocócica** – Estado de São Paulo. Atualização em 22/10/2014. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/meni_dados.html> Acesso em: 24 maio 2015.

SMALL, S. P. Preventing sciatic nerve injury from intramuscular injections: literature review. **Journal of Advance Nursing**, v. 47, n. 3, p. 287-296, 2004.

SOARES, M. B. P.; CARVALHO, L. C. P.; SANTOS, R. R. Banco de embriões de camundongos geneticamente modificados – uma estratégia para a preservação da diversidade genética em modelos experimentais murinos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 50-53, 2001.

STEPHENS, D. S.; WHITNEY, A. M.; MELLY, M. A.; HOFFMAN, L. H.; FARLEY, M. M.; FRASCH, C. E. Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *N. meningitidis*. **Infectious Diseases**, v. 51, p. 579-585, 1986.

STORNI, J.; KUNDIG, T. M.; SEN, G.; VOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen derived systems. **Advance Drug Delivery**, v. 578, p. 333- 355, 2005.

TAMARGO, B.; MÁRQUEZ, Y.; RAMÍREZ, W.; CEDRÉ, B.; FRESNO, M.; SIERRA, G.. New proteoliposome vaccine formulation from *N. meningitidis* serogroup B, without aluminum hydroxide, retains its antimeningococcal protectogenic potential as well as Th-1 adjuvant capacity. **BMC Immunology**, v. 14, p. S12, 2013. Suppl. 1.

TAVARES BATISTA, M.; SOUZA, R. D.; PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, E. L.; CAVALCANTE, R. C.; FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Gut adhesive *Bacillus subtilis* spores as a platform for mucosal delivery of antigens. **Infectious and Immunity**, v. 82, n. 4, p.1414-1423, 2014.

TERHUNE, T. D.; DETH, R. C. A role for impaired regulatory T cell function in adverse responses to aluminum adjuvant-containing vaccines in genetically susceptible individuals. **Vaccine**, v. 32, p. 5149-5155, 2014.

TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; BLOOM, B.. Trypanosoma cruzi: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. **Experimental Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 160–168, 1978.

TUNES, C. F.; FERRAZ, A. S.; SCOLA, M. C. G.; DE GASPARI E. N. Intranasal delivery of whole cells of neisseria species: study of cross - reactive antigens in rabbits. **The Open Vaccine Journal**, v. 1, p. 13-21, 2008.

TZANAKAKI, G.; HONG, E.; KESANOPOULOS, K.; XIROGIANNI, A.; BAMBINI, S.; ORLANDI, L.; COMANDUCCI, M.; MUZZI, A.; TAHA, M. Diversity of greek meningococcal serogroup B isolates and estimated coverage of the 4CMenB meningococcal vaccine. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 111, 7 p., 2014.

VEEKEN, H.; RITMEIJER, K.; HAUSMAN, B. Priority during a meningitis epidemic: vaccination or treatment? **Bulletin of World Health Organization**, v. 76, p. 135-141, 1998.

VILARINO, M. A. M. Técnicas de administração. In: CUNHA, J.; KREBS, L. S.; BARROS, E. et al. **Vacinas e imunoglobulinas: consulta rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 223-237.

VIPOND, C.; CARE, R.; FEAVERS, I. M. History of meningococcal vaccines and their serological correlates of protection. **Vaccine**, v. 30S, p. B10– B17, 2012.

VERMONT, C. L.; VAN DIJIKEN, H. H.; VAN LIMPT, C. J.; VAN ALPHEN, L.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P. Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. **Infectious and Immunity**, v. 70, p. 584-590, 2002.

WILSON-WELDER, J. H.; TORRES, M. P.; KIPPER, M. J.; MALLAPRAGADA, S. K.; WANNEMUEHLER, M. J.; NARASIMHAN, B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1278-1316, 2009.

YAZDANKHAH, S. P.; CAUGANT, D. A. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, pt. 9, p. 821-832, 2004.