

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

AMANDA IZELI PORTILHO

Imunização parenteral e de mucosas com Vesículas de Membrana Externa de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C visando reatividade com sorogrupo W em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção de título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

AMANDA IZELI PORTILHO

Imunização parenteral e de mucosas com Vesículas de Membrana Externa de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C visando reatividade com sorogrupo W em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

São Paulo

2021

RESUMO

PORTILHO, A.I. **Imunização parenteral e de mucosas com Vesículas de Membrana Externa de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C visando reatividade com sorogrupo W em camundongos.** 2021. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A doença meningocócica invasiva (DMI), provocada por *Neisseria meningitidis*, ocorre globalmente, contudo, regiões em desenvolvimento sofrem os maiores impactos da doença. No Brasil, os principais sorogrupos isolados são B e C, e observa-se a emergência do sorogrupo W. Esse trabalho propõe o estudo, em camundongos, da imunização com vesículas de membrana externa (OMVs) de cepa brasileira de *N. meningitidis* C que apresenta as proteínas porinas 2a e P1.5, comuns ao sorogrupo W; sendo as cepas utilizadas para o estudo classificadas como C:2a:P1.5 e W:2a:P1.5,2. Fêmeas adultas, da linhagem A/Sn (H2^a), foram imunizadas por sistema *prime-booster* utilizando 4 doses intranasais (IN) e reforço intramuscular (IM) com OMVs associadas à toxina colérica subunidade B (TCB) ou por sistema de duas doses IM com OMVs associadas ao hidróxido de alumínio (HA). Os animais foram acompanhados até que fossem idosos. A resposta imune foi avaliada por ELISA, *Immunoblotting*, *Dot-blot*, Imunohistoquímica e ELISpot. Os adjuvantes contribuíram para indução de maiores títulos de anticorpos. OMV+TCB induziu títulos de anticorpos estatisticamente superiores ao controle pré-imune após as 4 doses IN e manteve superioridade em todas as faixas etárias. OMV+HA alcançou diferença estatística em relação ao controle após a dose de reforço e manteve a diferença até a meia-idade. Todos os grupos apresentaram IgG de índice de avidéz elevado, independente do uso de adjuvantes. A razão IgG1/IgG2a foi intermediária em grupos imunizados com OMVs sozinhas e alta em grupos imunizados com OMVs associadas a adjuvantes. Os anticorpos reconheceram antígenos de pesos moleculares atribuídos à Porina A, importante para proteção específica contra a cepa de imunização, à Adesina A de *Neisseria* e à Proteína de ligação à transferrina, importantes para reatividade cruzada com cepas diferentes. Os anticorpos reconheceram antígenos da cepa heteróloga W:2a:P1.5,2, além de cepas representativas da circulação dos sorogrupos B, C e Y no Brasil. A caracterização celular dos baços, feita pelos marcadores anti-CD68, anti-CD4, anti-CD79 e anti-CD25, não apontou diferenças entre os camundongos idosos e indivíduo adulto. Também não se observou diferenças na população celular de grupos imunes e controles, porém, esplenócitos dos camundongos imunes, idosos, produziram IL-4 e IL-17 quando estimulados com as OMVs e com o polissacarídeo capsular C de meningococo. Por fim, concluiu-se que o uso de adjuvantes e a administração de doses de reforço favoreceram a elevação dos títulos de anticorpos e sua manutenção por períodos maiores; estimulou a diferenciação da resposta imune em perfil Th2; levou ao reconhecimento de mais antígenos e à secreção de maiores quantidades de citocinas.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. Doença meningocócica invasiva. Vesículas de membrana externa (OMVs). Hidróxido de alumínio. Toxina colérica subunidade B.

ABSTRACT

PORTILHO, A.I. **Parenteral and mucosal immunization with Outer Membrane Vesicles from *Neisseria meningitidis* serogroup C aiming cross-reactivity with serogroup W in mice.** 2021. 106 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Invasive meningococcal disease (IMD), caused by *Neisseria meningitidis*, occurs globally, however, developing countries deal with greater burden of the disease. In Brazil, the main serogroup isolated is serogroup C, and the emergence of serogroup W has been seen. This work studied, in mice, the immunization with outer membrane vesicles (OMVs) of a Brazilian strain of *N. meningitidis* C that presents porin proteins 2a and P1.5, common to serogroup W; the phenotypic characterization of the strains used was C:2:a:P1.5 and W:2a:P1.5,2. Adult females of A/Sn (H2^a) mice were immunized by prime-booster regimen with 4 intranasal (IN) doses and one intramuscular (IM) booster dose with OMVs associated with cholera toxin subunit B (CTB); or by two IM doses regimen with OMVs associated with aluminium hydroxide (AH). The mice were followed until old age. The immune response was evaluated by ELISA, Immunoblotting, Dot-blot, Immunohistochemistry and ELISpot. The adjuvants contributed to the induction of higher antibody titers. OMV+CTB triggered antibodies titers statistically higher than pre-immune control following 4 IN doses and maintained this superiority during all ages. OMV+AH needed a booster dose to reach statistical difference in comparison with control, maintaining it until middle-age. All groups presented a high avidity index of IgG, regardless of the adjuvant use. The IgG1/IgG2a ratio was intermediary in groups immunized with OMVs alone and higher in groups immunized with OMVs associated with adjuvants. The antibodies recognized antigens of molecular weight attributed to porin A, an important protein to respond specifically against the immunization strain, to Neisserial Adhesin A and Transferrin-binding proteins, important for cross-reactivity with different strains. The antibodies also recognized antigens of heterologous strain W:2a:P1.5,2 and strains which represent the circulation of serogroups B, C and Y in Brazil. The cellular characterization of spleens, marked with anti-CD68, anti-CD4, anti-CD79 and anti-CD25, did not point to differences between old and adult mice. Also, it was not observed difference between the cellular populations of immune and control groups, however, splenocytes of immunized, elderly mice, produced IL-4 and IL-17 when stimulated with OMVs and capsular polysaccharide C of meningococci. It was concluded that adjuvant use and booster doses improved the antibody titers and their persistence for longer periods, provided a Th2 type of immune response, led to the recognition of more antigens and the secretion of higher quantities of cytokines.

Keywords: *Neisseria meningitidis*. Invasive meningococcal disease. Outer membrane vesicles (OMVs). Aluminum hydroxide. Cholera toxin subunit B.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença meningocócica invasiva

1.1.1. Agente causador: *Neisseria meningitidis*

Neisseria é um gênero de bactérias Gram-negativas, imóveis, aeróbias, não-esporuladas, que se apresentam como diplococos. Diversas espécies fazem parte da microbiota do trato respiratório superior humano. Entre o gênero, *N. gonorrhoeae* é estritamente patogênica, provocando infecções na mucosa genital, anal e da orofaringe; e *N. meningitidis*, ou meningococo, pode colonizar a orofaringe humana, estabelecendo portadores saudáveis ou causando a doença meningocócica invasiva (DMI) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; LEMOS; ELIAS JUNIOR; CAMPOS, 2015).

A primeira descrição da doença meningocócica é atribuída ao Dr. Gaspard Vieusseux e ocorreu na cidade de Genebra, em 1805. A bactéria foi isolada pela primeira vez em 1887, pelo Dr. Anton Weichselbaum, em Viena. Ao longo do século XX, diversos surtos e epidemias de doença meningocócica foram descritos pelo mundo (VILLENA, 2012). A bactéria é transmitida pelo contato com secreções respiratórias de enfermos ou portadores assintomáticos. Fatores ligados à cepa, como patogenicidade e virulência, e ao hospedeiro, como o estado do sistema imunológico, determinam a evolução da infecção. Os principais grupos de risco para desenvolver a doença meningocócica são crianças menores de 2 anos, jovens adultos e idosos. Adolescentes e jovens adultos são apontados como os principais portadores, responsáveis pela transmissão do meningococo. Situações de aglomeração e climas com baixa umidade relativa do ar favorecem a transmissão da bactéria (ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). O período de incubação do patógeno varia de 3 a 10 dias; as primeiras manifestações da infecção são inespecíficas, como febre, náuseas, vômito e sonolência, seguidos de sintomas característicos, como rigidez da nuca e *rash* purpúrico. Se não tratada, a doença pode evoluir para choque, falência múltipla de órgãos e óbito em até 24 horas (BRANCO; AMORETTI; TASKER, 2007; NADEL; NINIS, 2018). O método diagnóstico considerado padrão-ouro é o isolamento de *N. meningitidis* em cultura. Outras técnicas laboratoriais empregadas são o exame quimiocitológico e bacterioscopia do líquido cefalorraquidiano, prova de aglutinação do látex, PCR (do inglês *polymerase chain reaction*,

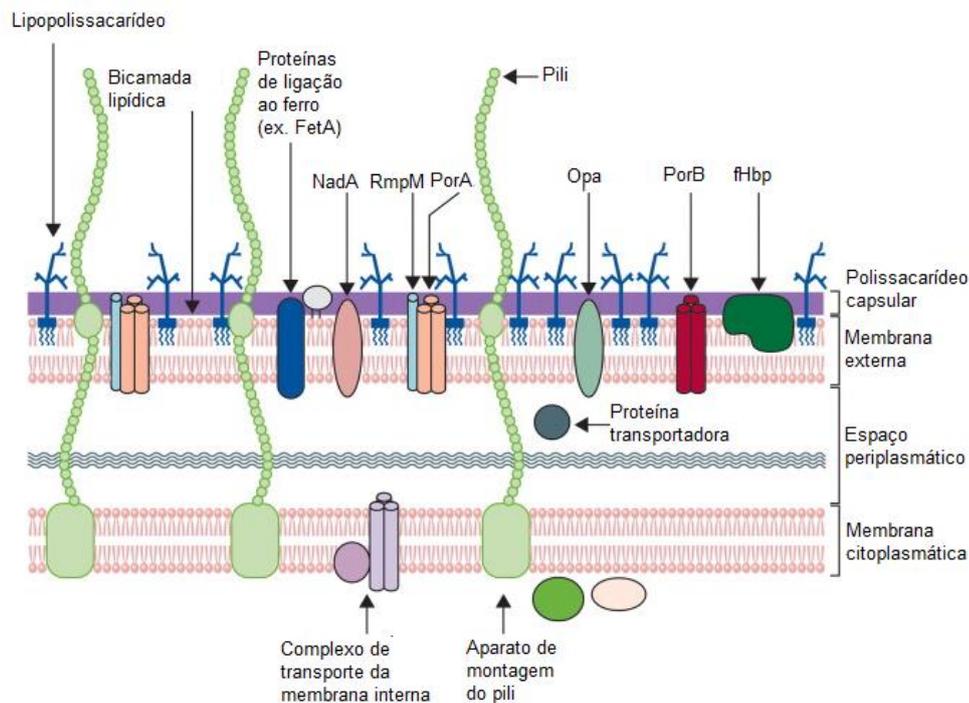
reação da cadeia em polimerase) e PCR em tempo real. As principais amostras utilizadas para o diagnóstico são o líquido e o sangue ou soro. O tratamento preconizado se dá por cefalosporinas de terceira geração, penicilina ou ampicilina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O meningococo apresenta diversos fatores de virulência. A cápsula polissacarídica, que reveste a bactéria, a protege inibindo tanto a fagocitose como a morte mediada pelo sistema complemento e é importante para a sobrevivência intracelular. Raramente cepas não capsuladas provocam doença (POLLARD; FRASCH, 2001; ROUPHAEL; STEPHENS, 2012). O lipooligossacarídeo (LOS) atua na adesão e invasão ao tecido, inibe a fagocitose e ativação do sistema complemento e, dado seu arranjo na superfície celular, pode influenciar a exposição de antígenos e, conseqüentemente, a relação patógeno-hospedeiro. Além disso, é altamente imunogênico e o principal responsável por induzir a inflamação durante a infecção (POOLMAN; HOPMAN; ZANEN, 1985; KAHLER; STEPHENS, 1998). O pili é responsável pela interação entre a bactéria e as células do hospedeiro e pela motilidade, o que contribui para que o meningococo ultrapasse a barreira hemato-encefálica, e medeia a troca de DNA por transformação. O pili do meningococo encontra-se na família do pili tipo IV, frequentemente estudado devido à sua importância para bactérias Gram-negativas (TZENG; STEPHENS, 2000; COUREUIL et al. 2009; WEYAND et al., 2013).

Os componentes antigênicos, também chamados de proteínas de membrana externa, ou OMPs (do inglês *outer membrane proteins*) possuem diversos papéis na patogenicidade da bactéria. As porinas, ou proteínas de Classe 1 (Porina A ou PorA) e de Classe 2/3 (Porina B ou PorB), são canais iônicos responsáveis por trocas entre a bactéria e o meio (MASSARI et al., 2003). Rmp (do inglês *Reduction modifiable protein*, proteína modificável por redução) é uma proteína auxiliar para ancoragem das porinas e parece interagir com proteínas sequestradoras de ferro e contribuir para a expressão e outros antígenos, influenciando no seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (MAHARJAN et al., 2016). Diversas adesinas propiciam adesão e invasão da bactéria ao tecido do hospedeiro, como a adesina A de *Neisseria*, NadA (do inglês *Neisserial Adhesin A*) e a proteína de opacidade, ou apenas Opa (do inglês *Opacity protein*). A cápsula polissacarídica, o LOS e o pili também são considerados adesinas, já que colaboram para invasão e adesão ao tecido (HUNG; CHRISTODOULIDES, 2013). A proteína de ligação à transferrina, ou Tbp (do inglês *Transferrin binding-protein*) sequestra ferro do hospedeiro, processo importante para sobrevivência do meningococo durante a infecção, já que este é um elemento chave para

processos metabólicos da bactéria (SCHRYVERS; STOJILJKOVIC, 1999; FEAVERS; PIZZA, 2009). A proteína de ligação ao fator H, fHbp (do inglês *factor H binding protein*) e a proteína de superfície A de *Neisseria*, NspA (do inglês *Neisserial surface protein A*) inibem a ativação do sistema complemento pela via alternativa, contribuindo para que o patógeno escape do sistema imune (LEWIS; CARTER; RAM, 2012). O antígeno de ligação à heparina de *Neisseria*, ou NHBA (do inglês *Neisserial Heparin Binding Antigen*) liga-se à heparina e ao heparan-sulfato, aumentando a resistência de *N. meningitidis* no soro e sua capacidade de ligar-se ao endotélio (MARITAN et al., 2018). A figura 1 mostra a estrutura da membrana externa do meningococo e seus antígenos.

Figura 1 – Membrana externa de *N. meningitidis*



fHbp: *factor H binding protein*; Por: Porin; NadA: *Neisseria Adhesin A*; Opa: *Opacity protein*; RmpM: *Reduction modifiable protein*. Fonte: Adaptado de Sadarangani e Pollard (2010).

Além de apresentar diversos antígenos, *N. meningitidis* é capaz de modificar a expressão destes através dos mecanismos de variação de fase e variação antigênica: no primeiro, um gene pode ser expresso ou não, de modo reversível, garantindo uma maior heterogeneidade entre as bactérias; o segundo trata-se da expressão de um mesmo antígeno com diferenças estruturais, o que pode driblar o sistema imune do hospedeiro (PALMER; BANKHEAD; SEIFERT, 2016). Além disso, a bactéria é naturalmente competente para realizar

transferência horizontal de genes, que pode colaborar com essa heterogeneidade. Atribui-se a essa característica a dificuldade de se encontrar vacinas amplamente eficazes contra o meningococo (CAUGANT; BRYNILDSRUD, 2020). Até a cápsula polissacarídica, utilizada como imunizante, passa por variação – processo conhecido como “troca de cápsula”: a bactéria, estimulada por pressão do sistema imune do hospedeiro, recebe informação de cepa de um sorogrupo diferente por troca horizontal de genes e passa a expressar outro tipo de cápsula polissacarídica (SWARTLEY et al., 1997). A troca de cápsula é tão importante que é atribuído a ela a emergência do meningococo de cápsula do tipo W durante o Hajj, peregrinação islâmica à Meca, no ano de 2000, o que provocou surtos de doença meningocócica em diversos países (TAHA et al., 2000). O LOS é outro antígeno que sofre variação de fase: após estabelecimento na orofaringe de um portador, apoiada pela expressão do LOS tipo L8, a bactéria altera a expressão para o LOS tipo L3,7,9, que contribui para a doença invasiva (JONES et al., 1992; BRAUN et al., 2002).

Urwin et al. (2004) descrevem que, apesar da variedade de antígenos no meningococo, àqueles relacionados à patogenicidade tendem a ser mantidos. De fato, a frequência de determinados fenótipos entre clones invasivos é expressiva. Isso demonstra a importância de caracterizar as cepas circulantes de *N. meningitidis*, o que fornece informações sobre virulência, permite prever surtos e indica antígenos-chave para imunização (PORTILHO; TRZEWIKOSWKI DE LIMA; DE GASPARI, 2020).

1.1.2. Classificação de *Neisseria meningitidis*

N. meningitidis é classificada fenotipicamente por um painel de anticorpos monoclonais, que difere as cepas entre sorogrupos, sorotipos, subtipos e imunotipos. Os sorogrupos são classificados com base na natureza imunoquímica da cápsula polissacarídica; os sorotipos, a partir da Porina B; os subtipos, a partir da Porina A e os imunotipos, pelo LOS (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985). Deste modo, a nomenclatura para as cepas se dá, por exemplo:

C:2a:P1.5 – sorogrupo C, sorotipo 2a, subtipo P1.5. Portanto, os anticorpos monoclonais para caracterização do polissacarídeo capsular C, para a Porina B 2a e para a Porina A P1.5 reconheceram a cepa.

O imunotipo é sinalizado pela letra -L seguida do número reagente. Cepas dos sorogrupos B e C apresentam, frequentemente, o imunotipo L3,7,9. Os imunotipos L10 e L12 foram relacionados, até agora, ao sorogrupo A e o imunotipo L8, às cepas de colonização assintomática. Entre cepas invasivas, é comum que se encontre o imunotipo L3,7,9, todavia, a bactéria pode alterar a expressão do LOS durante o processo de infecção (JONES et al., 1992; BRAUN et al., 2002).

Métodos moleculares também são empregados para caracterização das cepas, o que aprofunda o conhecimento sobre a filogenia das espécies. A técnica MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) baseia-se no perfil de migração de enzimas da bactéria em eletroforese para agrupá-las em tipos eletroforéticos ou ETs (do inglês *electrophoretic type*), caso possuam não mais que 2 enzimas com perfis de migração diferentes. O PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) consiste na digestão do DNA por endonucleases para formar fragmentos de alto peso molecular, os quais, quando submetidos à eletroforese de campo pulsado, migram formando padrões específicos que permitem distinguir polimorfismos, caracterizando as cepas (YAKUBU; ABADI; PENNINGTON, 1999).

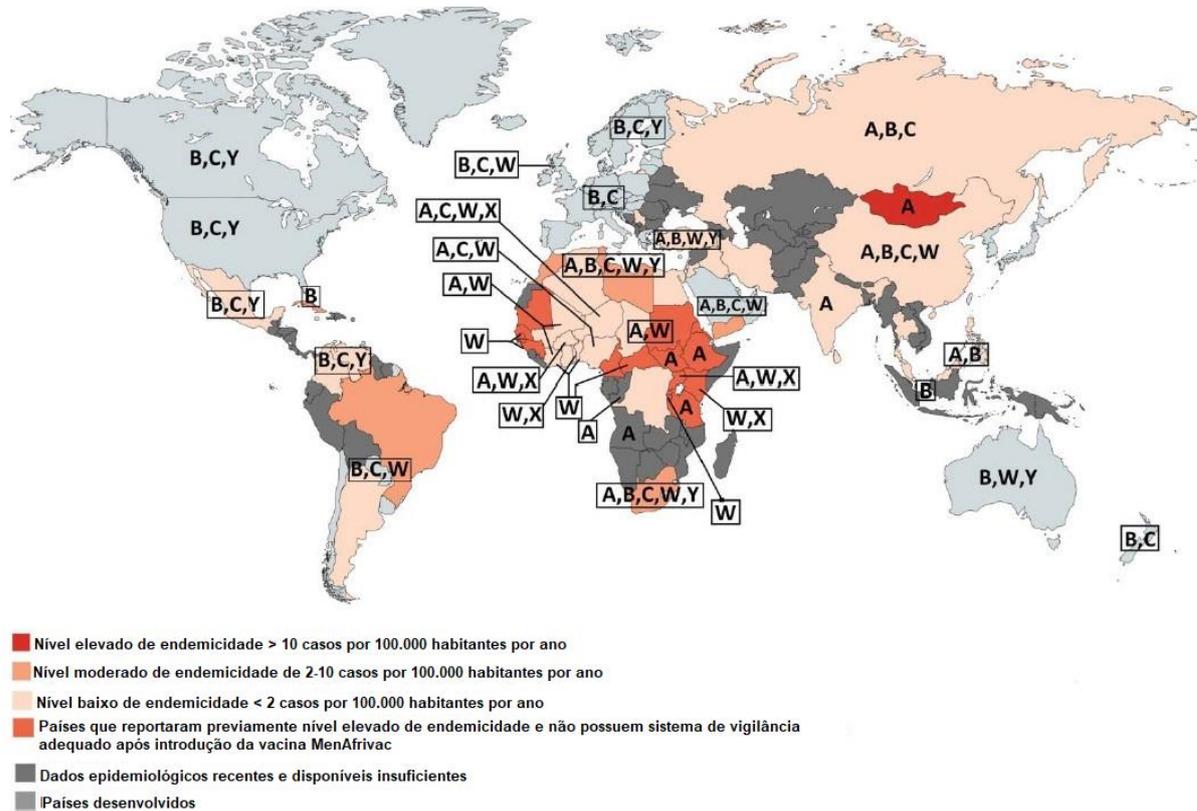
O MLST (*multilocus sequence typing*) é uma ferramenta de tipagem genética utilizada na caracterização de diversos patógenos, que foi padronizada primeiramente com *N. meningitidis*. Sete genes constitutivos da bactéria são sequenciados e permitem a classificação dos tipos de sequência ou STs (do inglês *sequence types*), equivalentes aos ETs do MLEE. Cepas que compartilham 4 desses 7 genes são, ainda, agrupadas em complexos clonais, ou CCs (do inglês *clonal complex*) (MAIDEN et al., 1997; MAIDEN, 2006).

1.1.3. Epidemiologia

A DMI é considerada um problema de saúde pública devido à rápida progressão da doença, que causa elevados índices de morbimortalidade, e pela sua capacidade de provocar surtos e epidemias. Estima-se que existam 1,2 milhões de novos casos e 135 mil óbitos no mundo anualmente (JAFRI et al., 2013). Dentre os 12 sorogrupos conhecidos de meningococo, 6 são frequentemente relacionados à doença invasiva: sorogrupos A, B, C, W, X e Y. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o impacto das infecções meningocócicas não é exato devido à falta de sistemas adequados de vigilância ou às diferenças entre estes, contudo, países em desenvolvimento são mais afetados pela doença (BORROW et al., 2017; SHAKER; FAYAD; DBAIBO, 2018). A figura 2 mostra a

distribuição dos sorogrupos de meningococo pelo mundo e o nível de endemicidade da doença meningocócica em países em desenvolvimento.

Figura 2 – Distribuição de sorogrupos de *N. meningitidis* e impacto da DMI nos países em desenvolvimento



Fonte: Adaptado de Shaker, Fayad e Dbaibo (2018).

No Brasil, o primeiro caso de doença meningocócica invasiva foi registrado em 1906, seguido por surtos esporádicos entre imigrantes. Em 1911, registrou-se o primeiro caso em nativo brasileiro e até 1919 observou-se elevação nos índices da doença, porém, sem ultrapassar níveis endêmicos (MORAES; BARATA, 2005).

Entre 1920 e 1926, São Paulo enfrentou a primeira epidemia de doença meningocócica, causada principalmente pelo meningococo A, responsável por aproximadamente 75% dos casos, os demais sendo atribuídos ao sorogrupo C. Essa epidemia acompanhou as dificuldades socioeconômicas da 1ª Guerra Mundial e a Pandemia de Influenza de 1918, já que a doença meningocócica faz parte das infecções bacterianas propiciadas por infecções virais do trato respiratório (CARTWRIGHT et al., 1991; MORAES; BARATA, 2005; JAFRI et al., 2013).

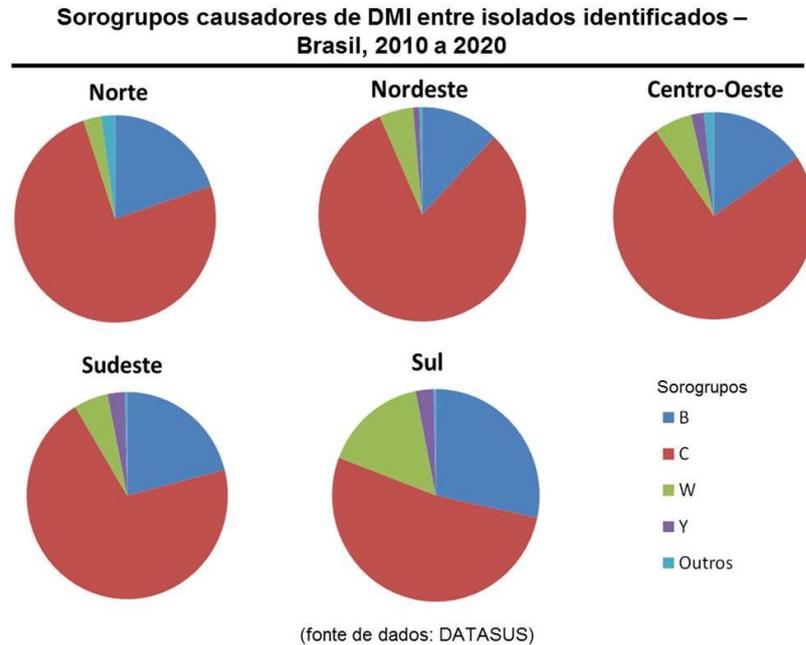
Entre 1937 e 1944, as sulfonamidas e a penicilina passaram a ser utilizadas no tratamento da infecção. Em 1945 o Brasil observou sua segunda epidemia de doença meningocócica, que atingiu seu pico em 1947 e retornou a índices endêmicos apenas em 1952. Provocada pelo sorogrupo A, essa epidemia também é associada ao período pós-guerra, contudo, a letalidade da infecção foi diminuída pela melhoria do atendimento hospitalar e uso de antibióticos. Nas décadas de 1950 e 1960, diversos países, incluindo o Brasil, observaram surtos esporádicos e flutuações nos níveis de endemicidade da doença (MORAES; BARATA, 2005).

Em 1970, registrou-se epidemia de meningococo C resistente à sulfonamida que, em 1974, foi sobreposto pelo meningococo A (MORAIS et al.; 1974). A década de 1980 apresentou elevação constante dos casos de doença meningocócica, o que denunciava a epidemia que teria início em 1988, provocada pelo sorogrupo B. Alguns autores sugerem que, se contados apenas os casos provocados por este sorogrupo, o período não poderia ser considerado epidêmico, porém, a soma de casos de MenB e MenC ultrapassam o limiar endêmico (SACCHI et al., 1992). O pico da epidemia ocorreu em 1996 e terminou apenas em 2002. O aumento lento e o tempo prolongado da epidemia são característicos do sorogrupo B. A letalidade deste período foi menor, visto os avanços tecnológicos e a disseminação das informações sobre a doença, que colaboram com seu controle (MORAES; BARATA, 2005).

De 2010 a 2020, foram notificados 187.508 casos de DMI, dos quais 9.095 foram sorogrupo. Destes, 69,66% foram identificados como MenC; 20,57% como MenB; 6,8% como MenW e 2,4% como MenY. No geral, a prevalência dos sorogrupos C e B se manteve ao longo dos anos. Todavia, ao se observar a distribuição entre faixas etárias ou estados, os percentuais dos sorogrupos podem diferir (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Na região Sul, tem aumentado a incidência de MenW, o que se deve à elevação desse sorogrupo em países vizinhos, como Argentina, Chile e Uruguai. Esse aumento é atribuído ao potencial patogênico do clone W:2a:P1.5,2, pertencente ao complexo clonal 11 (WEIDLICH et al., 2008; LEMOS et al., 2010).

A figura 3 mostra a distribuição proporcional dos sorogrupos causadores de DMI nas regiões do Brasil, permitindo observar como MenW é mais prevalente na região Sul.

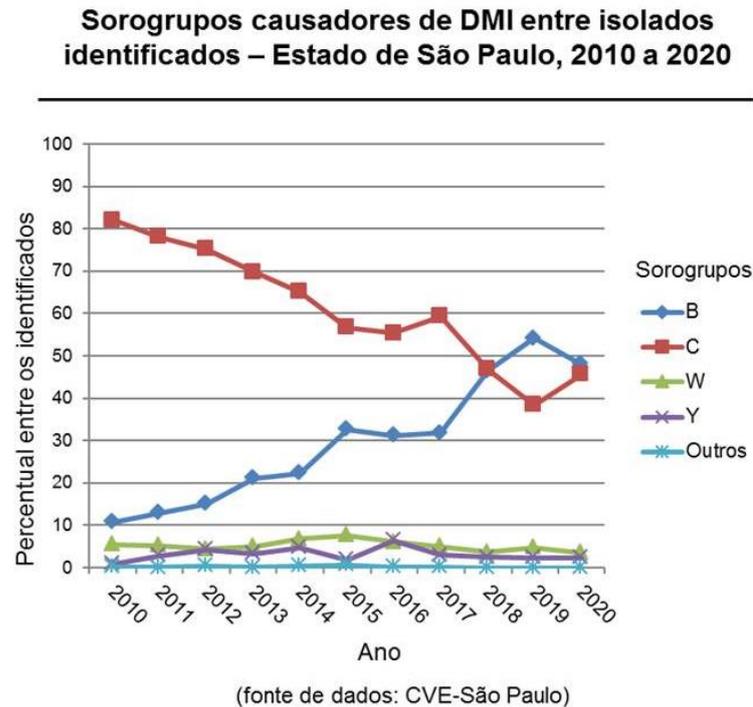
Figura 3 – Distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* entre os isolados identificados de DMI, por região, no Brasil



Fonte: Elaborado pelo autor com base em dados obtidos do Ministério da Saúde/DATASUS (2021).

Já no estado de São Paulo, em 2020, o percentual entre isolados sorogradados contava com 48,1% de Men B; 45,7% de MenC; 3,7% de MenW e 2,5% de MenY (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2021). Como observado na figura 4, o isolamento de cepas do sorogrupo C encontra-se em queda desde 2010, enquanto o sorogrupo B cresce. Porém, entre 2019 e 2020 houve uma inversão, com a incidência de MenB caindo e de MenC, crescendo. Isso mostra o dinamismo da distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis*, o que reforça a necessidade de vigilância sobre a doença (BOOY et al., 2019).

Figura 4 – Distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* entre os isolados identificados de DMI, no estado de São Paulo, de 2010 a 2020



Fonte: Elaborado pelo autor com base em dados obtidos do Governo do Estado de São Paulo/Centro de Vigilância Epidemiológica (2021).

De modo geral, a doença meningocócica é endêmica no Brasil, com incidência de aproximadamente 1 caso a cada 100.000 habitantes, apresentando surtos esporádicos. A letalidade está na faixa de 20%, mas pode chegar a 50% em casos de meningococemia. A infecção é de notificação compulsória e o país conta com um programa de vigilância que visa monitorar a situação epidemiológica da doença para avaliar as medidas de controle, detectar surtos de maneira precoce, monitorar os sorogrupos prevalentes e o perfil de resistência das cepas, além de disseminar essas informações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; GORLA et al., 2018).

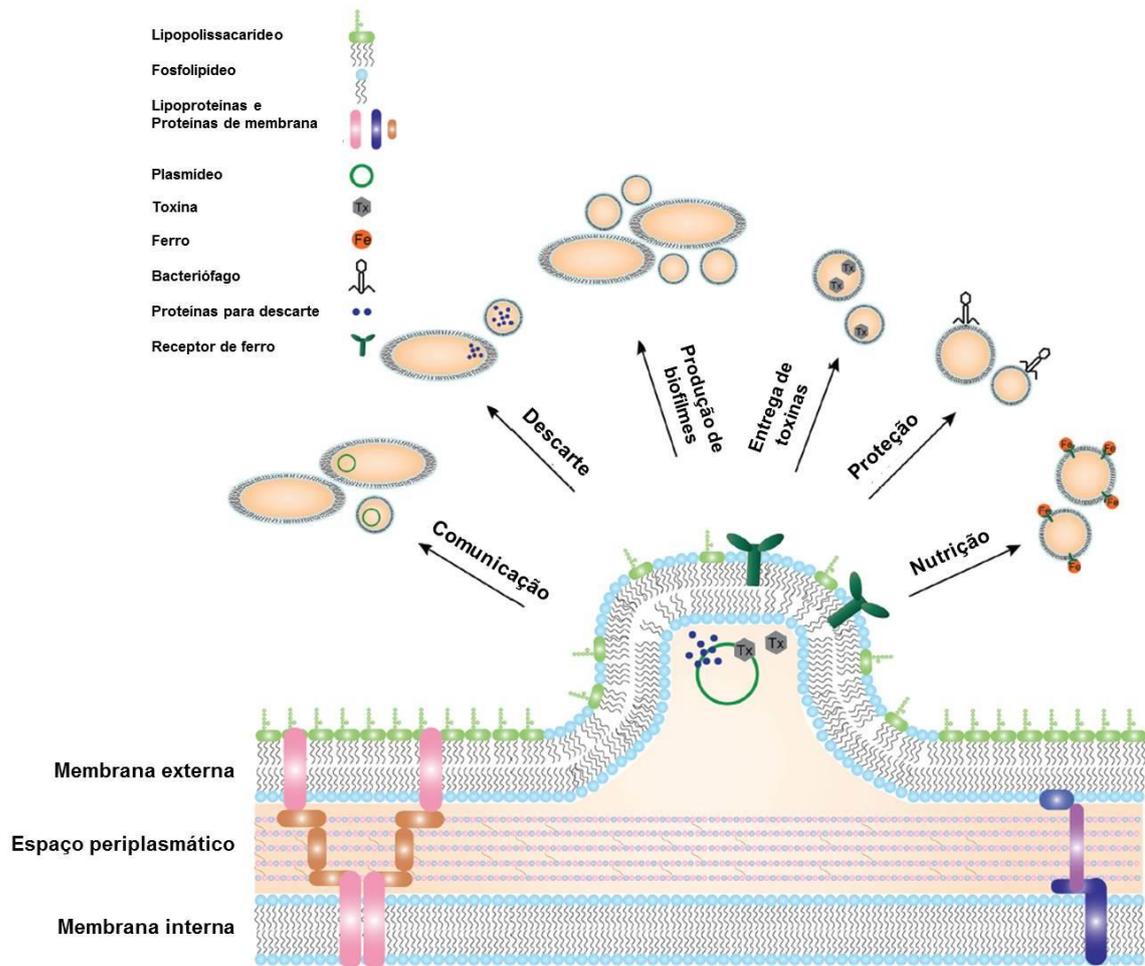
A vacina meningocócica conjugada C está no Programa Nacional de Imunizações (PNI) brasileiro desde 2010, sendo administrada em crianças aos 3 e 5 meses, com reforço aos 12 meses. Após a implementação da vacina, a incidência da doença meningocócica caiu apenas nos grupos vacinados. Para atingir o grupo de portadores, o que diminuiria ainda mais o nível de endemicidade da doença, em 2017 inseriu-se dose única em adolescentes de 12 a 13 anos e, em 2018, esse reforço passou a abranger a faixa dos 11 aos 14 anos (PRESA et al., 2019). Por conta da emergência de MenW nas Américas e sua elevação no Sul do país, em 2020 o

Ministério da Saúde substituiu a dose de reforço da vacina contra o meningococo C em adolescentes pela vacina quadrivalente contra os sorogrupos A, C, W e Y (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

1.1.4. Vesículas de membrana externa (OMVs)

As bactérias Gram-negativas possuem membranas interna e externa, separadas pelo espaço periplasmático, que contém peptidoglicano. Ambas as membranas possuem fosfolípídeos e proteínas; a membrana externa também expressa lipopolissacarídeo (LPS) (ALTERTHUM, 2015). O processo de vesiculação da membrana externa acontece naturalmente, formando as vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer membrane vesicles*), que apresentam diversas funções: comunicação com outras bactérias, até mesmo de espécies diferentes; transporte de proteínas, DNA ou RNA; descarte de metabólitos ou proteínas mal-formadas; aquisição de nutrientes; entrega de toxinas ou outros fatores de virulência ao hospedeiro; proteção contra bacteriófagos e formação de biofilmes (KULP; KUEHN, 2010). O processo pode ser estimulado em cultura para obtenção de maiores concentrações de vesículas, utilizando-se diferentes métodos e culminando em diferentes constituições antigênicas (BALHUIZEN; VELDHUZIEN; HAAGSMAN, 2021). A figura 5 mostra a estrutura e componentes da membrana externa durante a formação das vesículas, e resume suas funções biológicas.

Figura 5 – Estrutura, componentes e funções das vesículas de membrana externa



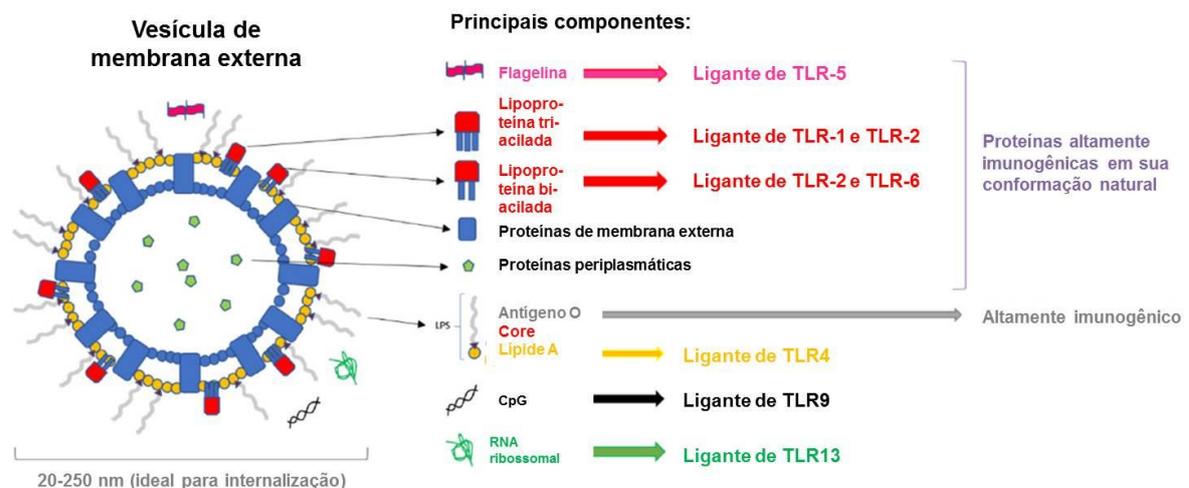
Fonte: Adaptado de Balhuizen, Veldhuizen e Haagsman (2021).

A obtenção de OMVs com a finalidade de preparar vacinas frequentemente utiliza o método de estímulo da vesiculação com o detergente deoxicolato, o qual promove, concomitantemente, a detoxificação do LPS – dada sua natureza extremamente reatogênica, a administração desse antígeno em ensaios pré-clínicos deve ser limitada a 200 U/mL por dose. Quando outros procedimentos de extração são empregados, a detoxificação do LPS deve ser conduzida posteriormente. Um ponto negativo é a perda de outros componentes das OMVs junto da retirada do LPS, visto que este antígeno influencia na ligação de outros antígenos à membrana (BRITO; SINGH, 2011; ACEVEDO et al., 2014).

O estudo das OMVs como imunizantes contra *N. meningitidis* se iniciaram devido à necessidade de antígenos vacinais contra o sorogrupo B – a cápsula polissacarídica, que é utilizada contra os demais sorogrupos, não pode ser empregada. Composta de ácidos polissíalicos $\alpha 2 \rightarrow 8$ capsulares, ela mimetiza a molécula adesão celular neuronal humana, logo, é pouco imunogênica e seu uso atrelaria risco de autoimunidade (FINNE; LEINONEN; MÄKELÄ, 1983). Frasch et al. (1976) iniciaram testes de imunização com OMVs do

meningococo B, que se mostraram promissores. Nas décadas seguintes foram licenciadas as vacinas baseadas em OMVs MENZB (Novartis), MenBvac (Instituto Norueguês de Saúde Pública) e Va-Mengoc-BC (Instituto Finlay), que controlaram surtos de doença meningocócica na Nova Zelândia, Noruega, e Cuba, respectivamente (PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020; SIERRA-GONZÁLEZ, 2020). A vacina recombinante Bexsero® (GlaxoSmithKline) também inclui, em sua formulação, OMVs de uma cepa epidêmica do meningococo B (GIULIANI et al., 2006; GREEN et al., 2016). Atualmente, as únicas vacinas de OMVs licenciadas previnem contra a doença meningocócica. Contudo, autores sugerem que o uso dessa plataforma para vacinas contra a coqueluche, provocada por *Bordetella pertussis*, é promissor: enquanto vacinas acelulares são menos imunogênicas e vacinas celulares são mais reatogênicas, vacinas de OMVs seriam o meio termo, conferindo resposta efetiva e menor reatogenicidade (BALHUIZEN; VELDHUZIEN; HAAGSMAN, 2021). Também se sugere o uso de OMVs como adjuvantes para vacinas contra outros patógenos, já que seu tamanho (20-250 nm) é adequado para internalização em células do sistema imune e é composta por diversas estruturas agonistas dos receptores do tipo Tol (TLR), como flagelina, ilhas CpG, RNA ribossomal, LPS e lipoproteínas que ativam a resposta inata (MANCINI et al., 2020). A figura 6 mostra as estruturas presentes nas OMVs que interagem com receptores do tipo Tol, além de proteínas de membrana que diferem entre as espécies e podem conferir resposta específica e memória imunológica.

Figura 6 – Conformação das OMVs, estruturas presentes e interação com a resposta imune inata



CpG: citosina-fosfato-guanina; TLR: *Tol-like receptor*. Fonte: Adaptado de Mancini et al. (2020).

As vantagens conferidas pela plataforma de OMVs consistem na facilidade técnica, agilidade e baixo custo, o que é importante para países em desenvolvimento, porém, deve ser

levada em consideração a influência do método de extração na sua constituição final, o que pode variar a composição antigênica, além da dominância de determinados antígenos, natural entre cada espécie bacteriana (VAN DER POL; STORK; VAN DER LEY, 2015; BALHUIZEN; VELDHUZIEN; HAAGSMAN, 2021).

No caso de *N. meningitidis*, as porinas B (que classifica os sorotipos) e A (que classifica os subtipos) predominam no conteúdo das OMVs, tornando as formulações sorosubtipo específicas. Sendo assim, são eficazes no controle de surtos provocados por determinadas cepas, mas não conferem proteção ampla, ao contrário das vacinas que empregam o polissacarídeo capsular. A vacina Va-Mengoc-BC, por exemplo, teve eficácia de 83% em Cuba mas, quando utilizada para controle do surto de doença meningocócica das décadas de 1980 e 1990 em São Paulo, variou em eficácia de 55 a 73% (SIERRA-GONZÁLEZ, 2020).

Em contrapartida, alguns estudos sugerem que as OMVs de meningococo induzem maior reatividade cruzada do que a literatura clássica defende. Petousis-Harris et al. (2017) associaram a diminuição da incidência de gonorreia, provocada por *N. gonorrhoeae*, em população vacinada com a vacina MeNZB. O mesmo foi observado em população vacinada com a vacina Va-Mengoc-BC (SIERRA-GONZÁLEZ, 2020). Biolchi et al. (2020a e 2020b) verificaram que anticorpos induzidos pela vacina Bexsero® (GlaxoSmithKline) apresentavam atividade bactericida frente cepas de diferentes sorogrupos e discute que as OMVs podem colaborar para isto.

Por fim, o uso de OMVs para produção de vacinas ainda deve ser considerado, vista a efetividade em controle de surtos, acessibilidade da tecnologia, versatilidade da entrega em mucosa ou por via parenteral e capacidade de imunomodulação (ACEVEDO et al., 2014; BALHUIZEN; VELDHUZIEN; HAAGSMAN, 2021).

1.1.5. Vacinas meningocócicas

A imunização contra *N. meningitidis* tem se mostrado eficiente para controle da doença. Esta pode acontecer naturalmente, a partir do contato com espécies não patogênicas de *Neisseria*, como *N. lactamica*, *N. subflava* e *N. cinerea*, o que induz reatividade cruzada com papel protetor, ou pode ser adquirida por vacinação (POLLARD; FRASCH, 2001).

As primeiras vacinas meningocócicas foram desenvolvidas na década de 1910 e eram constituídas por células íntegras inativadas pelo calor, as quais foram utilizadas por mais de 30 anos, contudo, dada sua baixa eficácia e o surgimento das sulfonamidas para tratamento e

controle das infecções, deixaram de ser utilizadas. Por volta de 1960 surgiram cepas resistentes às sulfonamidas, o que impulsionou a pesquisa por outros meios de controle. No final da mesma década, as vacinas constituídas pela cápsula polissacarídica passaram a ser utilizadas, entretanto, estas eram pouco imunogênicas, vista a natureza T independente do polissacáride, que é um pobre indutor de resposta imune em crianças (o principal grupo de risco para a doença), e não gera memória imunológica nas demais faixas etárias. Após 20 anos, as mesmas vacinas foram conjugadas a proteínas, como toxoide tetânico ou toxoide diftérico, o que garantiu resposta T dependente de memória e vacinas eficazes, independentemente da faixa etária (NADEL; NINIS, 2018; HOLLINGSHEAD; TANG, 2019).

Conforme exposto anteriormente (item 1.1.4), a inadequação da cápsula polissacarídica como imunizante contra o meningococo B estimulou a pesquisa dos antígenos de membrana externa. No final da década de 1980 e durante a década de 1990, foram empregadas as vacinas de OMVs Va-Mengoc-BC, MeNZB e MenBvac (PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020). A pesquisa de vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B também acompanhou o campo da vacinologia reversa, que identifica candidatos a antígenos vacinais a partir do sequenciamento do genoma. Essa ferramenta foi aplicada na pesquisa de antígenos imunogênicos e de heterogeneidade limitada que pudessem ser utilizados para imunização abrangente contra MenB, superando a principal desvantagem das vacinas de OMVs, sorosubtipo específicas. Esses esforços geraram as vacinas Bexsero® (GlaxoSmithKline), composta pelos antígenos fHbp, NadA e NHBA; e Trumenba® (Pfizer), composta por duas variantes de fHbp (GIULIANI et al., 2006; GREEN et al., 2016).

Segundo Borrow et al. (2013) além de induzir imunidade efetiva e duradoura, uma vacina ideal contra o meningococo deve diminuir a colonização da orofaringe dos portadores e atingir a maior parte da população, o que leva à diminuição da transmissão do patógeno, protegendo, indiretamente, indivíduos não-vacinados.

1.2. Sistema Imune

1.2.1. Resposta imunológica sistêmica e de mucosas

O termo “imunidade” tem origem no latim *imunitas*, traduzido como proteção. Ao conjunto de células e moléculas envolvidas na proteção do organismo se dá o nome de sistema imune e sua ação coordenada e regulada recebe o nome resposta imune. Historicamente, os mecanismos imunológicos foram estudados para entender a defesa contra agentes infecciosos, mas, atualmente, compreende-se o sistema imunológico como um sistema de reconhecimento entre o próprio e o não próprio, o qual desencadearia a necessidade de proteção (MURPHY, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Didaticamente se divide a resposta imunológica entre inata e adaptativa, porém, existe grande interação entre elas. A resposta inata constitui a linha de defesa imediata do organismo, contando com barreiras físicas, químicas e microbiológicas, células fagocíticas, proteínas de fase aguda e do sistema complemento, enquanto a resposta adaptativa é mediada especialmente pelas células B e células T, que interagem de modo específico com o antígeno que desencadeou a resposta e são responsáveis pela memória imunológica. A resposta adaptativa tem início quando as chamadas células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam o antígeno em questão aos linfócitos T, responsáveis pela resposta celular e que também colaboram para a ativação dos linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos. As citocinas presentes no microambiente modulam a resposta para diferentes modos de atuação, conforme exposto na tabela 1 (PARKIN; COHEN, 2001; CRUVINEL et al., 2010; MESQUISTA JÚNIOR et al., 2010).

Tabela 1 – Polarização da resposta imune: células, citocinas e atuação

Célula precursora	Citocinas do microambiente	Célula diferenciada	Citocinas produzidas	Atuação
Th0	IL-12	Th1	IFN- γ , TNF- α	Resposta celular, patógenos intracelulares
	IL-4	Th2	IL-4, IL-5, IL-13	Resposta humoral, patógenos extracelulares
	TGF- β , IL-6	Th17	IL-17, IL-22	Inflamação mediada por células, patógenos extracelulares e de mucosa, autoimunidade
	TGF- β	Treg	TGF- β , IL-10	Imunorregulação, tolerância imunológica

IFN: interferon; IL: interleucina; TGF: fator de crescimento transformador; TNF: fator de necrose tumoral.

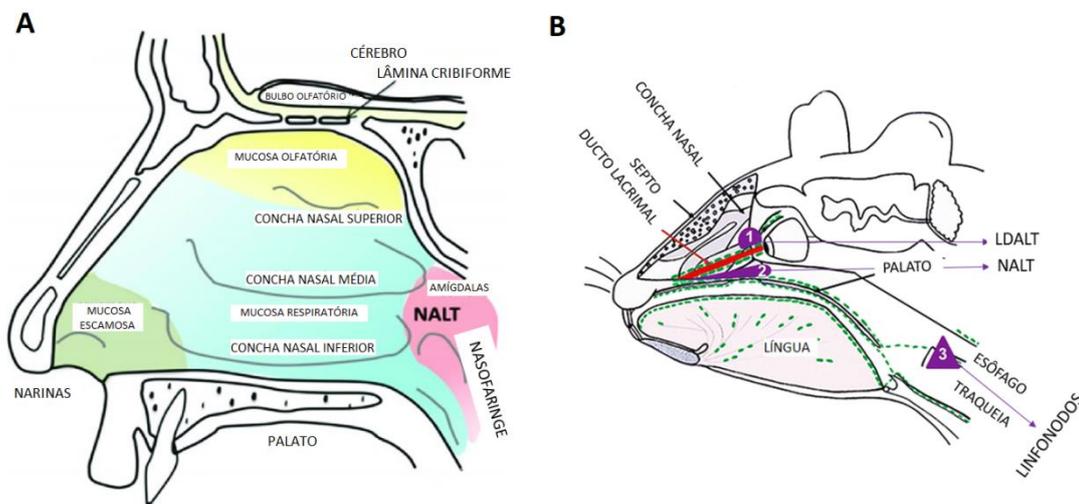
Fonte: Elaborado pelo autor com base nas descrições de Murphy (2014) e Abbas, Lichtman e Pillai (2015).

O chamado sistema imune regional está associado às mucosas, que recobrem o trato respiratório, gastrointestinal e urogenital. É comum referir-se a esses tecidos como MALT, do inglês *mucosa-associated lymphoid tissue* (tecido linfóide associado à mucosa). Em gestantes e lactantes, as glândulas mamárias também são consideradas parte desse sistema (MURPHY, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As principais funções do sistema imune de mucosas são: impedir a colonização e invasão por microrganismos potencialmente patogênicos; prevenir a sensibilização por partículas estranhas inofensivas, como de origem alimentar e, caso essa sensibilização ocorra, evitar que a resposta imunológica provoque danos ao próprio indivíduo. A competência do MALT, portanto, dependerá da adequação da resposta para cada situação; sendo guiada pela natureza antigênica, pelas APCs envolvidas na resposta e pelas características do microambiente (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). O equilíbrio entre as funções próprias da mucosa e a defesa do organismo é mediado pelas subpopulações de células T, especialmente células T regulatórias (Treg) (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006; MCGHEE; FUJIHASHI, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Na literatura, é comum encontrar nomenclaturas nas quais o tecido linfóide associado à mucosa se ramifica em GALT (*gut-associated lymphoid tissue*, tecido linfóide associado ao intestino), NALT (*nasopharynx-associated lymphoid tissue*, tecido linfóide associado à nasofaringe), BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*, tecido linfóide associado aos brônquios), LDALT (*lacrimal-drainage associated lymphoid tissue*, tecido linfóide associado aos ductos lacrimais), entre outros (BRANDTZAEG et al., 2008). A terminologia

NALT foi originalmente utilizada para descrever o tecido linfoide associado ao nariz de roedores, contudo, outros autores passaram a utiliza-la para se referir ao tecido linfoide associado à nasofaringe (PABST, 2015). Em humanos, é caracterizada pelas adenoides, na qual se vê tecido linfoide organizado, já nos roedores, esse tecido se organiza na base da concha nasal (KRAEHENBUHL; NEUTRA, 2000). A figura 7 mostra a localização e constituição do NALT em humanos e camundongos.

Figura 7 – NALT em humanos e camundongos



NALT (*nasopharynx-associated lymphoid tissue*) em (A) humanos e (B) camundongos. Fonte: Adaptado de Gänger e Schindowski (2018) e Lohrberg, Pabst e Wilting (2018).

A mucosa do trato respiratório reveste as passagens nasais, faringe, traqueia e árvore brônquica, estando frequentemente exposta a corpos estranhos presentes no ar, como microrganismos, pólen e partículas de poeira. É revestida por epitélio colunar ciliado pseudoestratificado, que atua como barreira física e química, dado o movimento dos cílios, as junções de oclusão entre células e produção e secreção de muco, defensinas e catelicidinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Sabe-se que a microbiota do trato respiratório não é tão densa e diversa quanto à do trato gastrointestinal, porém, tem papel importante na inibição da colonização por patógenos e na ativação do sistema imune (SEPAHI; SALINAS, 2015). Conforme revisão de Pabst (2015), estudos em modelo murino demonstraram a proporção de 50% de células T e 50% de células B no NALT, sendo que entre os linfócitos T prevalece a população CD4+.

1.2.2. Resposta imunológica contra *Neisseria meningitidis*

A presença de anticorpos bactericidas é o correlato de proteção contra *N. meningitidis*. Além disso, os anticorpos também contribuem com opsonização para fagócitos, ativação do sistema complemento e, ao se ligar a estruturas importantes para o patógeno, bloqueiam sua ação e levam à desestabilização da bactéria (POLLARD; FRASCH, 2001). Vários antígenos presentes nas OMVs são estudados quanto a estímulo da resposta humoral: anticorpos bactericidas anti-PorA e anti-PorB são relacionados à proteção (CARTWRIGHT et al., 1999); Opa é descrita como indutora de anticorpos bactericidas após a infecção natural e vacinação (POLLARD; FRASCH, 2001); anticorpos anti-NspA e anti-LOS também foram descritos como bactericidas (HOU et al., 2003; SCHMIEL et al., 2011). Tbp parece induzir tanto anticorpos bactericidas, como capazes de opsonizar e bloquear a ação da proteína no sequestro de ferro (PINTOR et al., 1996). A subunidade PilE, do pili de classe I, induz anticorpos com elevada especificidade e o pili de classe II, anticorpos de reatividade cruzada (GASPARINI et al., 2015). O polissacarídeo capsular, por sua vez, tem destaque na resposta imunológica aos sorogrupos A, C, W e Y, induzindo anticorpos com potencial de proteção contra a doença e utilizados na imunização por meio de vacinas conjugadas (POLLARD; FRASCH, 2001).

Mais recentemente, a importância da resposta imune inata e adaptativa celular tem sido investigada na infecção por *N. meningitidis*. Encontra-se bem estabelecido que o sistema complemento é importante para a defesa contra o meningococo: indivíduos com deficiências no complemento são mais suscetíveis à doença meningocócica, enquanto a atuação conjunta do sistema complemento e dos anticorpos confere uma melhor resposta imunológica (PIZZA; RAPPUOLI, 2015). Aponta-se que a fagocitose melhora o reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), contribuindo para reconhecimento da infecção, e atua no controle da disseminação do microrganismo e, conseqüentemente, da inflamação (JOHSWICH, 2017). Quanto à resposta celular, são encontradas células Th1 e Th2. O perfil Th2 é apontado como o perfil ideal de resposta, estimulando células B a produzir anticorpos, todavia, alguns trabalhos já relacionaram uma boa resposta imunológica contra o meningococo ao perfil Th1 (NÆSS et al., 2001; PÉREZ et al., 2001; POLLARD; FRASCH, 2001).

Quando se trata da resposta tipo Th17, já foi observada correlação entre colonização da nasofaringe por meningococo e mediadores de inflamação amparada por este perfil de resposta (WANG et al., 2020). González-Miró et al. (2018) observaram resposta mista Th1/Th17 após imunização subcutânea com NadA associada ao polissacarídeo capsular C. Um estudo comparativo de OMVs de *N. meningitidis* mostrou que OMVs expressando LOS modificado para diminuir toxicidade e aumentar a interação com células dendríticas foi mais efetiva em induzir secreção de IL-17 (JONES et al., 2014). Em contraponto, ao estudar a resposta de indivíduos que usam anticorpo monoclonal contra IL-17 à vacina meningocócica C conjugada, Chioato et al. (2012) não encontraram diferenças entre esses pacientes e grupo controle. Diante de observações diferentes, percebe-se que estudos para elucidar melhor o papel da resposta Th17 na doença meningocócica devem ser conduzidos.

1.3. Imunização

1.3.1. Vacinas parenterais e de mucosa

As práticas de imunização marcaram a história da medicina, contribuindo para o controle das doenças infecciosas. Para a OMS, um objetivo comum para os países é providenciar vacinas eficazes, seguras e acessíveis à população (VETTER et al., 2018; MAO; CHAO, 2020).

Atualmente, a maioria das vacinas licenciadas é administrada por vias parenterais, como intramuscular e subcutânea (SAVELKOUL et al., 2015). A natureza da preparação antigênica deve ser levada em consideração para escolha da via de administração. A via subcutânea, por exemplo, é preterida para vacinas atenuadas, enquanto a via intramuscular é de escolha para vacinas inativadas e que contenham hidróxido de alumínio na preparação (COOK, 2008). A administração intramuscular é menos associada aos incômodos no sítio de aplicação e efeitos adversos; e é capaz de induzir resposta imune sistêmica robusta a partir de baixas doses antigênicas, à qual é mediada principalmente por ativação de células T (ZIMMERMANN; CURTIS, 2019). Ainda que as vacinas de administração parenteral tenham um histórico de sucesso e garantam proteção em longo prazo, esbarram em questões como a manutenção de rede de frio, treinamento para aplicação, riscos inerentes ao uso de pérfuro-cortantes, podem

provocar dor e, eventualmente, fobia de agulhas, especialmente em crianças (ZHENG et al., 2018).

A resposta imunológica local é importante para proteção contra doenças nas quais o patógeno penetra pela mucosa e, para induzir a resposta local de modo eficaz, é ideal utilizar vacinas de mucosa. O reconhecimento da importância da imunidade de mucosas tem acelerado pesquisas na área (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). As vacinas de mucosa não são invasivas, reduzindo riscos por pérfuro-cortantes, são fáceis para aplicar e induzem imunidade sistêmica e nas mucosas (ZHENG et al., 2018). Contudo, passam pelos mesmos desafios enfrentados pelos patógenos: são diluídas nas secreções, onde estão sujeitas a atividade de enzimas proteolíticas; são capturadas pelo muco; barradas pelas células epiteliais; além de serem administradas em ambientes naturalmente tolerogênicos. Para tornar-se efetiva, é interessante que a vacina em questão tenha estrutura particulada ou multimérica, seja capaz de aderir à mucosa e assim, estimular as respostas inata e adaptativa (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). A tabela 2 mostra as vacinas de mucosa que já foram licenciadas.

Tabela 2 – Vacinas de mucosa atualmente licenciadas

Nome comercial	Formulação	Via de administração	Fabricante
Sabin	Poliovirus atenuado	Oral	FIOCRUZ (no Brasil)
Dukoral	<i>Vibrio cholerae</i> inativado + TCB	Oral	Shanta-Biotechnics
Shanchol	<i>Vibrio cholerae</i> inativado	Oral	Sanofi-Pasteur
Orochol	<i>Vibrio cholerae</i> (não expressa TCA) atenuado	Oral	Crucell
Vivotif	<i>Salmonella</i> Typhi atenuada	Oral	Crucell
RotaRix	Rotavirus atenuado (monovalente)	Oral	GlaxoSmithKline
Rotateq	Rotavirus atenuado (pentavalente)	Oral	Sanofi-Pasteur
FluMist	Influenza subtipos A e B atenuado	Nasal	AstraZeneca
NASOVAC	Influenza H1N1 atenuado	Nasal	Instituto de Soro da Índia

TCA: toxina colérica subunidade A; TCB: toxina colérica subunidade B. Fonte: Elaborado pelo autor com base nas descrições de Holmegren e Czerkinsky (2005) e Lycke (2012).

A compartimentalização do MALT também deve ser observada: ao imunizar determinado sítio de mucosa, a resposta se estende a compartimentos adjacentes ou conectados, devido à expressão de citocinas em diferentes órgãos. Essa característica deve ser levada em consideração para induzir resposta no sítio desejado. Estudos com imunização intranasal, por exemplo, mostraram IgA secretória na mucosa urogenital feminina, dada a expressão de CCR10 e $\alpha_4\beta_1$ -integrina por células B produtoras de IgA e sua migração para os sítios que apresentam os receptores CCL28 e VCAM1 (KIYONO; FUKUYAMA, 2004; HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

Quanto à vacinação intranasal, a primeira documentação sobre o assunto está em um texto de medicina chinesa de 1742 e consistiu em uma tentativa de imunização contra varíola. No ano 2000 foi licenciada a primeira vacina nasal para uso em humanos nos Estados Unidos, FluMist® (AstraZeneca), contra Influenza. O desenvolvimento dessa vacina propiciou o

investimento em pesquisas relacionadas ao NALT e à imunização intranasal (SEPAHI; SALINAS, 2015).

Após se atestar a conexão entre uma vacina intranasal de vírus Influenza inativado associado ao adjuvante toxina termolábil de *Escherichia coli* e casos de paralisia em nervo facial (Paralisia de Bell), entre 2002 e 2003, tornou-se evidente que vacinas intranasais devem considerar a proximidade anatômica entre a cavidade nasal e o sistema nervoso central (MUTSCH et al., 2004). Para aumentar sua segurança, estas vacinas devem utilizar adjuvantes e sistemas de transporte que direcionam o antígeno à mucosa nasal com segurança, prevenindo o depósito da formulação no sistema nervoso (NAKAHASHI-OUCHIDA; YUKI; KIYONO, 2018). Para Kiyono e Fukuyama (2004), o ponto chave para vacinas de mucosa é o desenvolvimento de adjuvantes seguros e eficazes para entrega do antígeno. Apesar das limitações e desafios, as vacinas de administração livre de agulhas são promissoras, especialmente em países em desenvolvimento e em situações epidêmicas (LAWSON; NORTON; CLEMENTS, 2011).

1.3.2. Adjuvantes

Os adjuvantes são componentes utilizados para garantir uma resposta efetiva após imunização. Podem potencializar a imunogenicidade de antígenos recombinantes ou purificados; modular a resposta imunológica para o perfil mais adequado de proteção; liberar o antígeno em mucosas, entre outras atuações (PETROVSKY; AGUILAR, 2004). Visto que as vacinas de subunidades possuem composição bem definida, sua produção pode ser menos laboriosa e seu uso é mais seguro, entretanto, costumam ser menos imunogênicas que vacinas atenuadas ou inativadas. Desta maneira, a busca por adjuvantes ideais deve unir os benefícios das vacinas de subunidades e uma resposta imunológica efetiva (SCHWENDENER, 2014).

Durante anos, os adjuvantes baseados em alumínio foram os únicos adjuvantes licenciados para uso humano, agregando custo relativamente baixo e segurança – o hidróxido de alumínio (HA) foi o mais utilizado (HE; ZOU; HU, 2015). Os mecanismos responsáveis pelo efeito adjuvante do hidróxido de alumínio não são completamente compreendidos, mas a indução de resposta inflamatória, o efeito de depósito que prolonga a interação entre antígenos e APCs, a capacidade de interação com macrófagos e o recrutamento de monócitos inflamatórios que podem se diferenciar em células dendríticas e migrar para linfonodos são as principais

explicações apontadas (HE; ZOU; HU, 2015; MARTIÑÓN et al., 2019). Em contrapartida, esses adjuvantes apresentam limitações: não podem ser liofilizados ou congelados e induzem resposta imune preferencialmente humoral (FRÉZARD, 1999; GOLÓS; LUTYNSKA, 2015). Porém, estudos indicam que, a depender do antígeno utilizado e via de administração, vacinas formuladas com hidróxido de alumínio podem induzir perfis mistos de resposta Th1/Th2 que garantiriam uma resposta imunológica mais ampla (HE; ZOU; HU, 2015). As vacinas Va-Mengoc-BC e Bexsero®, contra o meningococo B, por exemplo, utilizam o hidróxido de alumínio em sua composição (GIULIANI et al., 2006; SIERRA-GONZÁLEZ, 2020).

A toxina colérica (TC) é o principal fator de virulência de *Vibrio cholerae*. A toxina é composta por duas subunidades: A (TCA), responsável pela patogenicidade, e B (TCB), que age como veículo para entrega da TCA nas células e, mesmo isoladamente, possui ação adjuvante, apresentando bons resultados para imunização de vias de mucosa (BALDAUF et al., 2015). Encontra-se descrito na literatura que TCB contribui na apresentação dos antígenos às APCs e estimula células B, vista a presença do receptor GM1 nessas células, com o qual a TCB interage, induzindo, então, produção de IgA nos sítios de mucosa e de IgG sistêmica. O adjuvante pode estimular células T, dentre as quais ocorre polarização para subpopulação Th2, ainda que alguns autores indiquem perfis mistos Th1/Th2 (HOLMGREN; LYCKE; CZERKINSKY, 1993; STRATMANN, 2015). A toxina está presente na vacina Dukoral, contra *Vibrio cholerae* (HOLMEGREN; CZERKINSKY, 2005).

1.3.3. Vacinas para países em desenvolvimento

A acessibilidade das vacinas é um impeditivo para seu uso amplo. Observa-se que países em desenvolvimento tendem a introduzir menos vacinas em seus programas de imunização. A Organização Mundial da Saúde estima que em 2001, a imunização de uma criança segundo seu esquema vacinal custaria \$ 0,61, já em 2014, custaria \$ 32-45, devido à introdução de novas vacinas, mais caras e produzidas por até dois fabricantes (LANCET, 2015). Na análise de custos de Munira et al. (2019), a produção local de vacinas em países em desenvolvimento pode ser 47% mais barata se comparada à preços de mercado. Por vezes, o custo para purificação de antígenos para vacinas de subunidades é incompatível com a realidade de países em desenvolvimento (PAGLIUSI et al., 2013). Adjuvantes podem aumentar consideravelmente o custo de formulações, logo, deve-se estimular a investigação de adjuvantes adequados à realidade financeira de cada país (MIYAJI et al., 2011). A pesquisa

por imunizantes acessíveis, técnica e financeiramente, é necessária para garantir que populações mais pobres tenham acesso a vacinas de qualidade e que doenças infecciosas sejam controladas (CROWCROFT; DEEKS; UPSHUR, 2015).

A vacina MenAfriVac, contra o meningococo A, foi resultado de esforços para uma vacina conjugada acessível que pudesse ser usada na África, onde se localiza o Cinturão da Meningite, área na qual o impacto da doença é elevado e o desenvolvimento socioeconômico é limitado. O desenvolvimento de vacinas quadrivalentes para essa população também é estimulado (DRETLER; ROUPHAEL; STEPHENS, 2018). Isso reforça que, apesar da doença meningocócica se distribuir pelo mundo todo, países em desenvolvimento ainda sofrem os maiores impactos. Logo, a pesquisa por vacinas alternativas, de menor custo e maior facilidade de produção, adequadas para programas nacionais, contribui para o controle mundial da doença meningocócica (CROWCROFT; DEEKS; UPSHUR, 2015; SHAKER; FAYAD; DBAIBO, 2018; KAUFMANN, 2019).

6. CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo, conclui-se que:

- O uso de adjuvantes (TCB para via de mucosa e HA para via parenteral) contribuiu para indução de títulos de anticorpos significativamente maiores quando comparados aos controles, bem como para persistência de títulos elevados até a meia-idade dos camundongos, todavia, apenas TCB foi um adjuvante eficaz para manutenção dos títulos até a velhice;
- O índice de avidéz foi alto em os grupos imunes, independente do uso de adjuvantes, sugerindo que a cepa é imunogênica e capaz de induzir anticorpos funcionais, mesmo que em baixos títulos;
- As bandas do ensaio de *Immunoblotting* sugerem reconhecimento das proteínas NadA, Tpb e PorA de ambas as cepas (C:2a:P1.5 e W:2a:P1.5,2); sendo que a intensidade da reação e quantidade de antígenos reconhecidos foi maior no grupo OMV+TCB, seguido por OMV+HA e então, OMV IM/IM;
- No ensaio de *Dot-blot*, os grupos imunes reconheceram a cepa mais prevalente de MenC no Brasil no período de 2007 a 2017 (C:23:P1.14,6), todos os isolados testados de MenB e cepas representativas dos principais fenótipos de MenY nos últimos anos, sugerindo potencial de reatividade cruzada;
- Os animais idosos não apresentaram diminuição de linfócitos no baço, se comparados com indivíduo adulto;
- Não se observa diferença considerável entre as populações celulares do baço dos animais controle e imunes, porém, animais imunes secretaram IL-4 e IL-17 após estímulo antigênico;
- Tanto OMVs como PSC foram capazes de estimular esplenócitos a secretar IL-4 e IL-17;
- Os esplenócitos dos grupos imunizados com OMVs associadas a adjuvantes secretaram mais IL-4 e IL-17 quando comparados aos grupos sem adjuvantes e a imunização IN/IM colaborou para maior secreção de IL-17;
- A razão de isótipos IgG1/IgG2a e a secreção de IL-4 apontam para um perfil de resposta do tipo Th2, modulado pelos adjuvantes;

- Não se observou diferença entre administração *prime booster* ou parenteral para indução de títulos de anticorpos ou de citocinas. A administração de OMV+TCB se mostrou superior para persistência de títulos de anticorpos e indução de IL-17, todavia, a administração de 4 doses IN subsequentes não é promissora para calendários vacinais, exigindo estudos com menor número de doses para adequação do esquema.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2015.
- ABDILLAHI, H.; POOLMAN, J.T. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 48, n. 3, p. 367–371, 1987.
- ACEVEDO, R.; FERNÁNDEZ, S.; ZYAS, C.; et al. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. **Frontiers in Immunology**, v. 5, artigo 121, 2014.
- ALA'ALDEEN, D.A.A.; BORRIELLO, S.P. The meningococcal transferrin-binding proteins 1 and 2 are both surface exposed and generate bactericidal antibodies capable of killing homologous and heterologous strains. **Vaccine**, v. 14, n. 1, p. 49–53, 1996.
- ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. 2015. IN: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro:Atheneu, 2015. cap. 27.
- BALDAUF, K.J.; ROYAL, J.M.; HAMORSKY, K.T.; et al. Cholera toxin B: One subunit with many pharmaceutical applications. **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 974–996, 2015.
- BALHUIZEN, M.D.; VELDHUIZEN, E.J.A.; HAAGSMAN, H.P. Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, artigo 629090, 2021.
- BIOLCHI, A.; DE ANGELIS, G.; MOSCHIONI, M.; et al. Multicomponent meningococcal serogroup B vaccination elicits cross-reactive immunity in infants against genetically diverse serogroup C, W and Y invasive disease isolates. **Vaccine**, v. 38, n. 47, p. 7542–7550, 2020a.
- BIOLCHI, A.; TOMEI, S.; BRUNELLI, B.; et al. 4CMenB immunization induces serum bactericidal antibodies against non-serogroup B Meningococcal strains in adolescents. **Infectious Diseases and Therapy**, 2020b. doi: 10.1007/s40121-020-00370-x.
- BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D.; et al. A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. **Immunology**, v. 14, n. 1, p. 7-20, 1968.
- BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D.; et al. Cytodynamics of the immune response in two lines of mice genetically selected for ‘high’ and ‘low’ antibody synthesis. **Journal of**

Experimental Medicine, v. 135, n. 5, p. 1972.

BOOY, R.; GENTILE, A.; NISSEN, M.; et al. Recent changes in the epidemiology of *Neisseria meningitidis* serogroup W across the world, current vaccination policy choices and possible future strategies. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 15, n. 2, p. 470–480, 2019.

BORGES, C.S.C. **Avaliação da expressão imuno-histoquímica de proteínas transportadoras biliares em carcinoma hepatocelular e em colangiocarcinoma.** 2017. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. 184 p.

BORROW, R.; ABAD, R.; TROTTER, C.; et al. Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes. **Vaccine**, v. 31, n. 41, p. 4477-4486, 2013.

BORROW, R.; ALARCÓN, P.; CARLOS, J.; et al. The Global Meningococcal Initiative: global epidemiology, the impact of vaccines on meningococcal disease and the importance of herd protection. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 4, p. 313–328, 2017.

BRANCO, R.G.; AMORETTI, C.F.; TASKER, R.C. Doença meningocócica e meningite. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 2, p. 46–53, 2007.

BRANDTZAEG, P.; KIYONO, H.; PABST, R.; et al. Terminology: Nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 31–37, 2008.

BRAUN, J.M.; BLACKWELL, C.C.; POXTON, I.R.; et al. Proinflammatory responses to Lipo-oligosaccharide of *Neisseria meningitidis* immunotype strains in relation to virulence and disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 10, p. 1431–1438, 2002.

BRITO, L.A.; SINGH, M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, p. 34–37, 2011.

BRITO, L.T.; RINALDI, F.M.; GASPAR, E.B.; et al. Study of different routes of immunization using outer membrane vesicles of *Neisseria meningitidis* B and comparison of two adjuvants. **Vaccine**, v. 38, n. 48, p. 7674-7682, 2020.

CAUGANT, D.A.; BRYNILDSRUD, O.B. *Neisseria meningitidis*: using genomics to understand diversity, evolution and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 84-96, 2020.

CARTWRIGHT, K.A.V.; JONES, D.M.; SMITH, A.J.; et al. Influenza A and meningococcal disease. **The Lancet**, v. 338, n. 8766, p.554-557, 1991.

CARTWRIGHT, K.; MORRIS, R.; RÜMKE, H.; et al. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. **Vaccine**, v. 17, n. 20–21, p. 2612–2619, 1999.

CESTA, M.F. Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 455-465, 2006.

CHACKERIAN, B.; LOWY, 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, n. 3, p. 415–423, 2001.

CHARLES RIVER LABORATORIES. **LAL Gel-Clot Endosafe**. Instructions for use.

CHEN, M.; HARRISON, O.B.; BRATCHER, H.B.; et al. Evolution of ST-4821 clonal complex hyperinvasive and quinolone-resistant meningococci: the next meningococcal pandemic? Pré-print. **BioRxiv**, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.312546>

CHIOATO, A.; NOSEDA, E.; STEVENS, M.; et al. Treatment with the Interleukin-17A-Blocking Antibody Secukinumab does not Interfere with the efficacy of Influenza and Meningococcal vaccinations in healthy subjects: Results of an open-label, parallel-group, randomized single-center study. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1597-1602, 2012.

COMANDUCCI, M.; BAMBINI, S.; BRUNELLI, B.; et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1445–1454, 2002.

COOK, I.F. Evidence based route of administration of vaccines. **Human Vaccines**, v. 4, n. 1, p. 67–73, 2008.

COUREUIL, M.; MIKATY, G.; MILLER, F.; et al. Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. **Science**, v. 325, n. 5936, p. 83-87, 2009.

CROWCROFT, N.S.; DEEKS, S.L.; UPSHUR, R.E. Do we need a new approach to making vaccine recommendations? **BMJ (Online)**, v. 350, n. 308, p. 1–6, 2015.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; et al. Immune system - part I: Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 443–461, 2010.

DALSEG, R.; WEDEGE, H.; HOLST, J.; et al. Outer membrane vesicles of group B meningococci are strongly immunogenic when given intranasally to mice. **Vaccine**, v. 17, n. 19, p. 2336-2345, 1999.

DANVE, B.; LISSOLO, L.; MIGNON, M.; et al. Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. **Vaccine**, v. 11, n. 12, p. 1214–1220, 1993.

DE GASPARI, E. Application of prime-boost as a novel vaccination strategy against microbial pathogens. IN: MÉNDEZ-VILAS, A. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. p. 422–428. Formatex, 2011.

DE GASPARI, E.; ZOLLINGER, W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 143–153, 2001.

DE OLIVEIRA SANTOS, F.A.; LINCOPAN, N.; DE GASPARI, E. Evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization in neonatal mice using DODAB-BF as adjuvant with outer membrane vesicles of *Neisseria meningitidis* B. **Immunobiology**, v. 223, n. 12, p. 750–760, 2018.

DIMITROV, J.D.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAVERI, S.V. Important parameters for evaluation of antibody avidity by immunosorbent assay. **Analytical Biochemistry**, v. 418, n. 1, p. 149-151, 2011.

DRETTLER, A. W.; ROUPHAEL, N.G.; STEPHENS, D.S. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1146–1160, 2018.

GOLÓS, A.; LUTYNSKA, A. Thiomersal-containing vaccines – a review of the current state of knowledge. **Przegląd Epidemiologiczny**, v. 69, n. 1, p. 59–64, 2015.

FEAVERS, I.M.; PIZZA, M. Meningococcal protein antigens and vaccines. **Vaccine**, v. 27, n. 2, p. 42–50, 2009.

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, 2012.

FERREIRÓS, C.; FERREIRO, N.; CRIADO, M.T. Influence of adjuvants on the ability of anti-Tbp antibodies to block transferrin binding, iron uptake and growth of *Neisseria meningitidis*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 20, n. 7, p. 316–320, 2002.

FINNE, J.; LEINONEN, M.; MÄKELÄ, P.H. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: Implications for vaccine development and pathogenesis. **The Lancet**, v. 322, n. 8346, p. 355–357, 1983.

FRASCH, C.E.; PARKES, L.; McNELIS, R.M.; et al. Protection against group B meningococcal disease - Comparison of group-specific and type-specific protection in the chick embryo model. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 144, p. 319-329, 1976.

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

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

FRÉZARD, F. Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, p. 181–189, 1999.

FUKASAWA, L.O.; GORLA, M.C.O.; LEMOS, A.P.S.; et al. Immune response to native NadA from *Neisseria meningitidis* and its expression in clinical isolates in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 121-125, 2003.

GÄNGER, S.; SCHINDOWSKI, K. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: a review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 166, p. 1-28, 2018.

GASPAR, E.B.; ROSETTI, A.R.; LINCOPAN, N.; et al. *Neisseria lactamica* antigens complexed with a novel cationic adjuvant. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 572–581, 2013.

GASPARINI, R.; PANATTO, D.; BRAGAZZI, N.L.; et al. How the knowledge of interactions between meningococcus and the human immune system has been used to prepare effective *Neisseria meningitidis* vaccines. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 189153, 2015.

GEBERT, A.; PABST, R. M cells at locations outside the gut. **Seminars in Immunology**, v. 11, n. 3, p. 165-170, 1999.

GIULIANI, M.M.; ADU-BOBIE, J.; COMANDUCCI, M.; et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 10834–10839, 2006.

GNOPO, Y.M.D.; WATKINS, H.C.; STEVENSON, T.C.; et al. Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems – Reprogramming bacteria for vaccine delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 114, p. 132–142, 2017.

GONZÁLEZ-MIRÓ, M.; RODRÍGUEZ-NODA, L.M.; FARIÑAS-MEDINA, M.; et al. Bioengineered polyester beads co-displaying protein and carbohydrate-based antigens induce protective immunity against bacterial infection. **Scientific Reports**, v. 8, artigo 1888, 2018.

GORLA, M.C.; CASSIOLATO, A.P.; PINHATA, J.M.W.; et al. Emergence of resistance to ciprofloxacin in *Neisseria meningitidis* in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 286–288, 2018.

GORLA, M.C.; BRANDÃO, A.P.; PINHATA, J.M.W.; et al. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive meningococcal disease in Brazil from 2002 to 2017. **Access Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 34-43, 2020.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC. Meningites – Dados estatísticos. Disponível em: http://saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/meningites/dados/meningites_dados.pdf. Acesso em: 24 de março de 2021.

GRANOFF, D.M.; MASLANKA, S.E.; CARLONE, G.M.; et al. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to meningococcal C polysaccharide that correlate with bactericidal responses. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 4, p. 479–485, 1998.

GREEN, L.R.; EIDEN, J.; HAO, L.; et al. Approach to the discovery, development, and evaluation of a novel *Neisseria meningitidis* serogroup B vaccine. **Methods in Molecular Biology**, v. 1403, p. 445-469, 2016.

HE, P.; ZOU, Y.; HU, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477–488, 2015.

HOLLINGSHEAD, S.; TANG, C.M. An overview of *Neisseria meningitidis*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1969, p. 1-16, 2019.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4S, p. S45, 2005.

HOLMGREN, J.; LYCKE, N.; CZERKINSKY, C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. **Vaccine**, v. 11, n. 12, p. 1179–1184, 1993.

HOU, V.C.; MOE, G.R.; RAAD, Z.; et al. Conformational Epitopes Recognized by Protective Anti-Neisserial Surface Protein A Antibodies. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 12, p. 6844–6849, 2003.

HOU, Y.L.; YAN, T.; CAO, H.; et al. Chimeric hepatitis B virus core particles displaying Neisserial surface protein A confer protection against virulent *Neisseria meningitidis* serogroup B in BALB/c mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 6601-6613, 2019.

HUNG, M.C.; CHRISTODOULIDES, M. The biology of *Neisseria* adhesins. **Biology**, v. 2, n. 3, p. 1054–1109, 2013.

ITO, A.Y., NÉRI, S.; MACHADO, M.S.S.; et al. Homologous prime-boost strategy in neonate mice using *Neisseria lactamica*. **Vaccine**, v. 27, n. 25–26, p. 3422–3428, 2009.

JAFRI, R.Z.; ALI, A.; MESSONNIER, N.E.; et al. Global epidemiology of invasive meningococcal disease. **Population Health Metrics**, v. 11, n. 17, 2013.

JANEWAY JUNIOR, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5 ed. Garland Science:Nova Iorque, 2001.

JANETZKI, S. **ELISpot for rookies (and experts too)**. Springer Nature:Cham, 2016.

JANG, S.C.; KIM, S.R.; YOON, Y.J.; et al. In vivo kinetic biodistribution of nano-sized Outer Membrane Vesicles derived from bacteria. **Small**, v. 11, n. 4, p. 456-461, 2015.

JIN, Y.; JANG, J-W.; LEE, M-H.; et al. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin. **Clinica Chimica Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 260-266, 2006.

JOHSWICH, K. Innate immune recognition and inflammation in *Neisseria meningitidis* infection. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 2, p. 1–17, 2017.

JONES, D.M.; BORROW, R.; FOX, A.J.; et al. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 13, n. 3, p. 219–224, 1992.

JONES, H.E.; COPLAND, A.; HAMSTRA, H.J.; et al. LOS oligosaccharide modification enhances dendritic cell responses to meningococcal native outer membrane vesicles expressing a non-toxic lipid A. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 519-534, 2014.

KAHLER, C.M.; STEPHENS, D.S. Genetic basis for biosynthesis, structure and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 281-334, 1998.

KAMATH, A.T.; HENRI, S.; BATTYE, F.; et al. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1734-1741, 2002.

KAUFMANN, S.H.E. Highly affordable vaccines are critical for our continued efforts to reduce global childhood mortality. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, n. 11, p. 2660-2665, 2019.

KELLY, S.M.; LARSEN, K.R.; DARLING, R.; et al. Single-dose combination nanovaccine induces both rapid and durable humoral immunity and toxin neutralizing antibody responses against *Bacillus anthracis*. **Vaccine**, v. 39, n. 29, p. 3862-3870, 2021.

KIYONO, H.; FUKUYAMA, S. NALT- versus Peyer's-patch- mediated mucosal immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 4, n. 9, p. 699-710, 2004.

KRAEHENBUHL, J.; NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: Differentiation and Function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 301-332, 2000.

KULP, A.; KUEHN, M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 163-184, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANCET, editorial. What are affordable vaccines? **Lancet**, v. 385, n. 9965, p. 304, 2015.

LAWSON, L.B.; NORTON, E.B.; CLEMENTS, J.D. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 414–420, 2011.

LEMOS, A.P.S. **Descrição de um novo clone de *Neisseria meningitidis* Sorogrupo C, Grande São Paulo, 1990 a 2003**. 2005. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LEMOS, A.P.S.; HARRISON, L.H.; LENSER, M.; et al. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. **Journal of Infection**, v. 60, n. 3, p. 209–217, 2010.

LEMOS, A.P.; ELIAS JUNIOR, W.P.; CAMPOS, L.C. *Neisserias*. 2015. IN: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro:Atheneu, 2015. cap. 27.

LEWIS, L.A.; CARTER, M.; RAM, S. The relative roles of Factor H Binding Protein, Neisserial Surface Protein A, and Lipooligosaccharide sialylation in regulation of the alternative pathway of complement on meningococci. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 10, p. 5063–5072, 2012.

LI, M.; WANG, Y.; SUN, Y.; et al. Mucosal vaccines: Strategies and challenges. **Immunology Letters**, v. 217, p. 116–125, 2020.

LI, Z.; LI, Y.; WANG, Y.; HOU, Y.; CAO, H.; WU, X; et al. Intranasal immunization with a rNMB0315 and combination adjuvants induces protective immunity against *Neisseria meningitidis* serogroup B in mice. **International Immunopharmacology**, v. 93, p. 107411, 2021.

LOHRBERG, M.; PABST, R.; WILTING, J. Co-localization of lymphoid aggregates and lymphatic networks in nose- (NALT) and lacrimal duct-associated lymphoid tissue (LDALT) of mice. **BMC Immunology**, v. 19, n. 5, p. 1-8, 2018.

LUCIDARME, J.; HILL, D.M.C.; BRATCHER, H.B.; et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. **Journal of Infection**, v. 71, n. 5, p. 544–552, 2015.

LUIJKX, T.A. **Immunogenicity of meningococcal PorA antigens in OMV vaccines**. 2007. Dissertação (Mestrado em Infecção e Imunidade). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Utreque, Utreque.

LYCKE, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. **Nature Reviews on Immunology**, v. 12, n. 8, p. 592-605, 2012.

MAIDEN, M.C.J.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E.; et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1997.

MAIDEN, M.C.J. Multilocus Sequence Typing of bacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAHARJAN, S.; SALEEM, M.; FEAVERS, I.M.; et al. Dissection of the function of the RmpM periplasmic protein from *Neisseria meningitidis*. **Microbiology (Reading)**, v. 162, n. 2, p. 364–375, 2016.

MANCINI, F.; ROSSI, O.; NECCHI, F.; et al. OMV vaccines and the role of TLR agonists in immune response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4416, 2020.

MAO, H.H.; CHAO, S. Advances in Vaccines. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 171, p. 155–188, 2020.

MARITAN, M.; VEGGI, D.; COZZI, R.; et al. Structures of NHBA elucidate a broadly conserved epitope identified by a vaccine induced antibody. **PLoS One**, v. 13, n. 8, e0201922, 2018.

MARTIÑÓN, S.; CISNEROS, A.; VILLICAÑA, S.; et al. Chemical and immunological characteristics of aluminum-based, oil-water emulsion, and bacterial-origin adjuvants.

Journal of Immunology Research, v. 2019, 3974127, 2019.

MASSARI, P.; RAM, S.; MACLEOD, H.; et al. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 87–93, 2003.

MCGHEE, J.R.; FUJIHASHI, K. Inside the mucosal immune system. **PLoS Biology**, v. 10, n. 9, p. 1–5, 2012.

MEDINI, D.; STELLA, M.; WASSIL, J. MATS: Global coverage estimates for 4CMenB, a novel multicomponent meningococcal B vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 23, p. 2629-2636, 2015.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; et al. Sistema Imunitário – Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 552-580, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Meningite - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil. Brasília, 2021. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>>. Acesso em: 24 de março de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação**. 1 ed. Brasília, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 2 ed. Brasília, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Técnico – Orientações técnico operacionais para a vacinação dos adolescentes com a vacina meningocócica ACWY (conjugada)**. Brasília, 2020. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/16/Informe-ACWY-CRIE-10022020-final.pdf>>. Acesso em: 20 de novembro de 2020.

MIYAJI, E.N.; CARVALHO, E.; OLIVEIRA, M.L.S.; et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 6, p. 500-513, 2011.

MORAES, J.C.; BARATA, R.B. A doença meningocócica em São Paulo, Brasil, no século

XX: características epidemiológicas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1458-1471, 2005.

MORAIS, J.S.; MUNDFOORD, R.S.; RISI, J.B.; et al. Epidemic Disease due to Serogroup C *Neisseria meningitidis* in São Paulo, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 129, n. 5, p. 568-571, 1974.

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

MUNIRA, S.L.; HENDRIKS, J.T.; ATMOSUKARTO, I.N.; et al. A cost analysis of producing vaccines in developing countries. **Vaccine**, v. 37, n. 9, p. 1245-1251, 2019.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8 ed. Artmed:Porto Alegre, 2014.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Elsevier:Rio de Janeiro, 2009.

MUSTAPHA, M.M.; MARSH, J.W.; KRAULAND, M.G.; et al. Genomic Epidemiology of Hypervirulent Serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. **EBioMedicine**, v. 2, n. 10, p. 1447–1455, 2015.

MUTSCH, M.; ZHOU, W.; RHODES, P.; et al. Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 9, p. 896–903, 2004.

NADEL, S.; NINIS, N. Invasive Meningococcal Disease in the vaccine era. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n.321, p. 1–11, 2018.

NÆSS, L.M.; OFTUNG, F.; AASE, A; et al. T-Cell Responses Against Meningococcal Antigens. **Methods in Molecular Biology**, v. 66, n. 1, p. 339–348, 2001.

NAKASHASHI-OUCHIDA, R.; YUKI, Y.; KIYONO, H. Cationic pullulan nanogel as a safe and effective nasal vaccine delivery system for respiratory infectious diseases. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 9, p. 1–5, 2018.

NEUTRA, M.R.; KOZLOWSKI, P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, n. 2, p. 148–158, 2006.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J.V. Immunology: Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. **Science**, v. 310, n. 5753, p. 1510–1512, 2005.

OFTUNG, F.; KORSVOLD, G.E.; AASE, A. et al. Cellular immune responses in humans induced by two serogroup B meningococcal outer membrane vesicle vaccines given separately and in combination. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 4, p. 353–362, 2016.

PABST, R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT) - Structure, function and species differences. **Vaccine**, v. 33, n. 36, p. 4406–4413, 2015.

PAGLIUSI, S.; LEITE, L.C.C.; DATLA, M.; et al. Developing Countries Vaccine Manufacturers Network: Doing good by making high-quality vaccines affordable for all. **Vaccine**, v. 31, n. 2, p. B176–B183, 2013.

PALMER, G.U.Y.H.; BANKHEAD, T.; SEIFERT, H.S. Antigenic variation in bacterial pathogens. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, p. 1–28, 2016.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, 2001.

PÉREZ, O.; LASTRE, M.; LAPINET, J.; et al. Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection conferred by the Cuban anti-meningococcal BC vaccine. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4502–4508, 2001.

PETOUSIS-HARRIS, H. Impact of meningococcal group B OMV vaccines, beyond their brief. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1058–1063, 2018.

PETOUSIS-HARRIS, H.; PAYNTER, J.; MORGAN, J.; et al. Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. **The Lancet**, v. 390, n. 10102, p. 1603–1610, 2017.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v. 82, n. 5, p. 488–496, 2004.

PHILLIPS, R.; WILLIAMS, J.N.; TAN, W.M.; et al. Immunization with recombinant Chaperonin60 (Chp60) outer membrane protein induces a bactericidal antibody response against *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 31, n. 22, p. 2584- 2590, 2013.

PINTOR, M.A.R.; FERRÓN, L.; GÓMEZ, J.A.; et al. Blocking of iron uptake by monoclonal antibodies specific for the *Neisseria meningitidis* transferrin- binding protein 2. **Journal of Medical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 252–257, 1996.

PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. *Neisseria meningitidis* : pathogenesis and immunity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 68–72, 2015.

PIZZA, M.; BEKKAT-BERKANI, R.; RAPPUOLI, R. Vaccines against Meningococcal Diseases. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1521, 2020.

POLLARD, A.J.; GALASSINI, R.; VAN DER VOORT, E.M.; et al. Cellular immune responses to *Neisseria meningitidis* in children. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2452-2463, 1999.

POLLARD, A.J.; FRASCH, C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. **Vaccine**, v. 19, n. 11–12, p. 1327–1346, 2001.

POOLMAN, J.T. Expanding the role of bacterial vaccines into life-course vaccination strategies and prevention of antimicrobial-resistant infections. **NPJ Vaccines**, vol. 5, n. 1, p. 84, 2020.

POOLMAN, J.T.; HOPMAN, C.T.P.; ZANEN, H.C. Colony variants of *Neisseria meningitidis* strain 2996 (B:2b:P1.2) influence of Class-5 outer membrane proteins and lipopolysaccharides. **Journal of Medical Microbiology**, v. 19, p. 203-209, 1985.

PORTILHO, A.I.; TRZEWIKOSWIKI DE LIMA, G; DE GASPARI, E. *Neisseria meningitidis*: analysis of pili and LPS in emerging Brazilian strains. **Therapeutic Advances in Vaccine and Immunotherapy**, v. 8, p. 1-10, 2020.

PRESA, J.V.; ALMEIDA, R.S.; SPINARDI, J.R.; et al. Epidemiological burden of meningococcal disease in Brazil: A systematic literature review and database analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 80, p. 137–146, 2019.

RAEVEN, R.H.M.; BRUMMELMAN, J.; PENNING, J.L.A.; et al. Molecular signatures of the evolving immune response in mice following a *Bordetella pertussis* infection. **PLoS**

ONE, v. 9, n. 8, e104548, 2014.

REQUEJO, H.I.Z. Comportamento imunológico das vacinas anti-meningocócicas. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 402-416, 1997.

REYES, L.M.; LASTRE, M.; CUELLO, M.; et al. Adjuvants derived from *Neisseria meningitidis* Serogroup B induce a cross reactive response against *Neisseria gonorrhoeae* in mice. **Open Journal of Immunology**, v. 10, n. 3, p. 47-58, 2020.

ROUPHAEL, N.G.; STEPHENS, D.S. *Neisseria meningitidis*: Biology, microbiology, and epidemiology. **Methods in Molecular Biology**, v. 799, p. 1-20, 2012.

SACCHI, C.T.; PESSOA, L.L.; RAMOS, S.R.; et al. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1734-1738, 1992.

SADARANGANI, M.; POLLARD, A.J.; Serogroup B meningococcal vaccines – an unfinished history. **Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 112-124, 2010.

SASAKI, S.; SULLIVAN, M.; NARVAEZ, C.F.; et al. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 8, p. 3109-3119, 2011.

SAVELKOUL, H.F.J.; FERRO, V.A.; STRIOGA, M.M.; et al. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. **Vaccines (Basel.)**, v. 3, n. 1, p. 148–171, 2015.

SCHMIEL, D.H.; MORAN, E.E.; KEISER, P.B.; et al. Importance of antibodies to Lipopolysaccharide in natural and vaccine-induced serum bactericidal activity against *Neisseria meningitidis* group B. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 4146–4156, 2011.

SCHRYVERS, A.B.; STOJILJKOVIC, I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 1117–1123, 1999.

SCHWENDENER, R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 2, n. 6, p. 159–182, 2014.

SEPAHI, A.; SALINAS, I. The evolution of nasal immune systems in vertebrates. **Molecular Immunology**, v. 69, p. 131-138, 2015.

SHAHSAVANI, N.; SHEIKHHA, M.H.; YOUSEFI, H.; et al. In silico homology modeling and epitope prediction of NadA as a potential vaccine candidate in *Neisseria meningitidis*. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 7, n. 1, p. 53-68, 2018.

SHAKER, R.; FAYAD, D.; DBAIBO, G. Challenges and opportunities for meningococcal vaccination in the developing world. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1084–1097, 2018.

SIERRA-GONZÁLEZ, V.G. Cuban meningococcal vaccine VA-MENGOC-BC®: 30 years of use and future potential. **VacciMonitor**, v. 29, n. 1, p. 31–43, 2020.

SORHOUE-PEREIRA, C.; EFRON, A.; GAGETTI, P.; et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Neisseria meningitidis* disease-causing strains in Argentina, 2010. **PLoS One**, v. 8, n. 3, e58065, 2013.

STIASNY, K.; ABERLE, J.H.; KELLER, M.; et al. Age Affects quantity but not quality of antibody responses after vaccination with an inactivated *Flavivirus* vaccine against Tick-Borne Encephalitis. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34145, 2012.

STOTT, D.I. Immunoblotting and Dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, n. 2, p. 153-187, 1989.

STRATMANN, T. Cholera toxin subunit b as adjuvant – an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. **Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 579–596, 2015.

SUN, X.; STEFANETTI, G.; BERTI, F.; et al. Polysaccharide structure dictates mechanism of adaptive immune response to glycoconjugate vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 1, p. 193-198, 2019.

SWARTLEY, J.S.; MARFIN, A.A.; EDUPUGANTI, S.; et al. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 1, p. 271-276, 1997.

TAHA, M.K.; ACHTMAN, M.; ALONSO, J.M.; et al. Serogroup W135 meningococcal disease in Hajj pilgrims. **Lancet**, v. 356, n. 9248, p. 2159, 2000.

TAVANO, R.; FRANZOSO, S.; CECCHINI, P.; et al. The membrane expression of *Neisseria meningitidis* adhesin A (NadA) increases the proimmune effects of MenB OMVs on human macrophages, compared with NadA - OMVs, without further stimulating their proinflammatory activity on circulating monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 1, p. 143–153, 2009.

TRZEWIKOSWKI DE LIMA, G.; PORTILHO, A.I.; DE GASPARI, E. Cross-reactivity with Brazilian strains of *Neisseria meningitidis* B after immunization with outer membrane vesicles. **Therapeutics Advances in Vaccines and Immunotherapy**, v. 7, p.1-7, 2019.

TRZEWIKOSWKI DE LIMA, G.; DE GASPARI, E. Individual variability in humoral response of immunized outbred mice and cross-reactivity with prevalent Brazilian *Neisseria meningitidis* strains. **Biologicals**, v. 55, p. 19-26, 2018.

TRZEWIKOSWKI DE LIMA, G.; RODRIGUES, T.S.; PORTILHO, A.I.; et al. Immune responses of meningococcal B outer membrane vesicles in middle-aged mice. **Pathogens and Disease**, v. 78, n.5, ftaa028, 2020.

TSAI, C.M.; FRASCH, C.E.; MOCCA, L. F. Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 146, n. 1, p. 69–78, 1981.

TUNES, C.F.; FERRAZ, A.S.; SCOLA, M.C.G.; et al. 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.; URWIN, R.; MUSILEK, M.; et al. Phenotypic and Genotypic Approaches to Characterization of Isolates of *Neisseria meningitidis* from Patients and Their Close Family Contacts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1235-1240, 2001.

TZENG, Y.; STEPHENS, D.S. Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 6, p. 687–700, 2000.

URWIN, R.; RUSSEL, J.E.; THOMPSON, E.A.L.; et al. Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: Implications for vaccine design. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5955–5962, 2004.

VAN DER POL, L.; STORK, M.; VAN DER LEY, P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 11, p. 1689–1706, 2015.

VERMONT, C.L.; VAN DIJKEN, H.H.; VAN LIMPT, C.J.P.; et al. Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 584–590, 2002.

VETTER, V.; DENIZER, G.; FRIEDLAND, L.R.; et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 110–120, 2018.

VILLENA, R. Historia y epidemiología del meningococo. **Revista Chilena de Pediatría**, v. 83, n. 6, p. 533–539, 2012.

WANG, Z.; LIU, H.; WANG, F.; et al. A refined view of airway microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease at species and strain-levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 1758, 2020.

WEIDLICH, L.; BAETHGEN, L.F.; MAYER, L.W.; et al. High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5,2:ST-11 clone in Southern Brazil. **Journal of Infection**, v. 57, n. 4, p. 324–331, 2008.

WEYAND, N.J.; WERTHEIMER, A.M.; HOBBS, T.R.; et al. *Neisseria* infection of rhesus macaques as a model to study colonization, transmission, persistence, and horizontal gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 8, p. 3059–3064, 2013.

YAKUBU, D.E.; ABADI, F.J.R.; PENNINGTON, T.H. Molecular typing methods for *Neisseria meningitidis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 1055–1064, 1999.

YING, S.; HE, J.; YU, M.; et al. Recombinant *Neisseria* surface protein A is a potential vaccine candidate against *Neisseria meningitidis* serogroup B. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 3, p. 1619–1625; 2014.

ZHANG, Y.; GUO, X.; GUO, M.; et al. Combined prime-boost immunization with systemic and mucosal pneumococcal vaccines based on Pneumococcal surface protein A to enhance protection against lethal pneumococcal Infections. **Immunologic Research**, v. 67, n. 4-5, p. 398–407, 2019.

ZHENG, Z.; DIAZ-ARÉVALO, D.; GUAN, H.; et al. Noninvasive vaccination against infectious diseases. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 7, p. 1717–1733, 2018.

ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. Factors that influence the immune response to vaccination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1–50, 2019.

ZUGHAIER, S.M. *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides induce inflammatory responses via TLR2 and TLR4-MD-2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 3, p. 469-480, 2011.