ADRIANA FREITAS DE ALMEIDA

Avaliação do uso do Brometo de Dioctadecildimetilamônio como adjuvante complexado a antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B: Efeito da imunização materna pela via subcutânea e intranasal na resposta imune humoral da prole de camundongos

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

São Paulo
2018

ADRIANA FREITAS DE ALMEIDA

Avaliação do uso do Brometo de Dioctadecildimetilamônio como adjuvante complexado a antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B: Efeito da imunização materna pela via subcutânea e intranasal na resposta imune humoral da prole de camundongos

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

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2018

RESUMO

DE ALMEIDA, A.F. **Avaliação do uso do Brometo de Dioctadecildimetilamônio como adjuvante complexado a antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B:** Efeito da imunização materna pela via subcutânea e intranasal na resposta imune humoral da prole de camundongos. 2018. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A bactéria *Neisseria meningitidis* é um diplococo Gram-negativo. Dentre os sorogrupos de *N. meningitidis*, o sorogrupo B é um dos principais causadores da doença meningocócica invasiva (DMI), de ocorrência mundial. Recém-nascidos e crianças são especialmente susceptíveis a este tipo de infecção, uma vez que os seus sistemas imunitários ainda estão em desenvolvimento, assim mais estudos sobre a utilização da imunização materna para a proteção contra esta doença, são necessários. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial imunogênico dos antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* sorogrupo B em camundongos *Swiss* quanto ao efeito da imunização passiva na prole, além de analisar o efeito de diferentes adjuvantes na produção de anticorpos e transferencia materno-fetal destes. O hidróxido de alumínio (HA) e fragmentos de bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB-BF) foram utilizados como adjuvantes junto às vesículas de membrana externa (OMVs) para a imunização de camundongos adultos fêmeas, o que resultou em um aumento dos títulos de anticorpos do isótipo IgG quando comparado a imunização apenas com o antígeno, tanto pela via de imunização subcutânea com *booster* intramuscular (SC/IM), quanto pela via intranasal com *booster* subcutâneo (IN/SC). Esses anticorpos foram transferidos para a prole, que apresentou títulos de anticorpos significantes até o período no qual os camundongos apresentavam cinco semanas de vida. A imunização com OMVs + DODAB-BF foi capaz de gerar o reconhecimento específico de um maior número de antígenos que OMVs + HA, nos camundongos adultos fêmeas imunizados pela via SC/IM. A imunização com OMVs + DODAB-BF pela via SC/IM também resultou em anticorpos na prole que foram capazes de reconhecer antígenos proteicos da cepa homóloga e de cepas heterólogas, o que não ocorre quando essa imunização é realizada pela via IN/ SC. Apesar da presença de títulos de anticorpos na prole, estes irão apresentar funcionalidade diferente em comparação aos anticorpos da prole de mães imunizadas pela via SC/IM, sugerindo que a via SC/IM é melhor para a imunização materna com OMVs + DODAB-BF.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*. Imunização materna. Brometo de Dioctadecildimetilamônio. Hidróxido de Alumínio. Vias Subcutânea e Intranasal.

ABSTRACT

ALMEIDA, A.F. **Evaluation of the use of Dioctadecildimetilamônio Bromide as an adjuvant complexed to antigens of outer membrane of *Neisseria meningitidis* B:** Effect of maternal immunization by subcutaneous and intranasal routes on humoral immune response of mice offspring. 2018. 99f. Dissertation (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The *Neisseria meningitidis* bacterium is a Gram-negative diplococcus. Among the serogroups of *N. meningitidis*, serogroup B is one of the main causes of invasive meningococcal disease (IMD), worldwide occurrence. Newborns and children are particularly susceptible to this type of infection, since their immune systems are still developing, so further studies about the use of the maternal immunization to protect against this disease, are needed. The aim of this study was to evaluate the potential immunogenic antigens from outer membrane of *N. meningitidis* serogroup B in Swiss mice as to the effect of passive immunization in the offspring, in addition to analyze the effect of different adjuvants in the production of antibodies and maternal-fetal transfer of these. The aluminium hydroxide (HA) and bilayer fragments from dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB-BF) were used as adjuvants with the outer membrane vesicles (OMVs) for immunization of adult female mice, which resulted in an increase of the antibodies' titers of IgG isotype when compared to immunization with only the antigen, either by subcutaneous route of immunization with intramuscular booster (SC/IM), as by the intranasal route with subcutaneous booster (IN/SC). These antibodies were transferred to the offspring, which presented significant antibodies' titers to the period in which the mice had five weeks of live. Immunization with OMVs + DODAB-BF was able to generate the specific recognition of a greater number of antigens than OMVs + HA, in adult female mice immunized by SC/IM route. Immunization with OMVs + DODAB-BF SC/IM route also resulted in antibodies in offspring that were able to recognize protein antigens of the homologous strain and heterologous strains, which does not occur when this immunization is carried out by IN/SC route. Despite the presence of antibodies in the offspring, they will present different functionality compared to antibodies of the offspring of mothers immunized by SC/IM route, suggesting that the SC/IM route is better for maternal immunization with OMVs + DODAB-BF.

Keywords: *Neisseria meningitidis*. Maternal Immunization. Dioctadecyldimethylammonium Bromide. Aluminium Hydroxide. Subcutaneous and Intranasal Routes.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Neisseria meningitidis*, também conhecida como meningococo, é um diplococo, Gram-negativo, aeróbio, pertencente à família *Neisseriaceae*. Seu metabolismo é do tipo heterotrófico e, portanto, necessita de sais minerais, lactato, alguns aminoácidos e ácido glutâmico como fonte de carbono, algumas cepas também utilizam cistina ou sais de amônio como única fonte de nitrogênio (BRITO, 2015; LEMOS, 2005; SÁFADI; BEREZIN; OSELKA 2012).

Assim como todas as bactérias Gram-negativas, possui envoltório celular formado por duas camadas lipídicas e uma camada semirrígida de peptidoglicana. A camada mais externa, chamada de membrana externa, é constituída por lipídios, proteínas de membrana externa, do inglês *Outer membrane proteins* (OMPs), e lipopolissacarídeos (LPS), que também são referidos como lipooligossacarídeos (LOS). *N. meningitidis* apresenta também uma cápsula polissacarídica, associada a esta membrana externa, o que é típico dos meningococos (BRITO, 2015; SÁFADI; BEREZIN; OSELKA 2012).

Este microrganismo é um patógeno humano obrigatório, ou seja, somente consegue se replicar no portador humano, é capaz de causar a doença meningocócica invasiva (DMI) uma infecção aguda séria, de ocorrência mundial, com variações sazonais e manifestações epidêmicas localizadas, que está relacionada com a meningite (infecção das membranas que revestem o sistema nervoso central) e a meningococcemia (infecção generalizada) (SÁFADI; BEREZIN; OSELKA 2012).

Durante seu crescimento, *N. meningitidis* libera vesículas de membrana externa (OMVs, do inglês *Outer Membrane Vesicles*), chamadas também de *blebs*, que mantem um elevado nível de LPS na sua conformação natural (NAGAPUTRA et al., 2014; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007). Para o isolamento deste patógeno costuma-se utilizar o ágar sangue ou chocolate, tendo como base o ágar Muller-Hinton ou outro similar, para amostras usualmente estéreis, como o líquido cefalorraquidiano e o sangue. Para materiais biológicos originários de sítios contaminados, como a nasofaringe, os meios seletivos devem ser utilizados, assim o meio Thayer-Martin é recomendado para este tipo de cultivo. A temperatura ótima de crescimento é de 36-37 °C, sendo que o cultivo em Dióxido de carbono (3-10%) e umidade (50%) favorece o crescimento deste microrganismo (LEMOS, 2005).

1.1 Classificação dos meningococos

A classificação do meningococo pode ser realizada em sorogrupos, de acordo com a estrutura do antígeno polissacarídeo presente em sua cápsula, e também em sorotipos e subtipos (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985).

1.1.1 Sorogrupos

A partir da variação estrutural da cápsula polissacarídica de *N. meningitidis* é possível realizar a classificação dos meningococos em sorogrupos, sendo que atualmente, são conhecidos 12 sorogrupos (A, B, C, E, H, I, K, L, W, X, Y e Z). Os polissacarídeos capsulares que definem esses sorogrupos apresentam um bom potencial imunogênico em vacinas e dentre estes, seis sorogrupos (A, B, C, W, X e Y) são relacionados com a DMI (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985; HARRISON et al., 2013).

Esta bactéria possui a capacidade de alterar a expressão capsular quando necessário e modifica-la, sendo essas características fatores para o aparecimento e o potencial epidêmico do meningococo (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

1.1.2 Sorotipos e Subtipos

A membrana externa de *N. meningitidis* contém de 3 a 5 OMPs divididas em 5 diferentes classes estruturais que estão correlacionadas com seus pesos moleculares. Essas classes são designadas como classes 1, 2, 3, 4 e 5 e apresentam os seguintes pesos moleculares: 43 a 47 kDa (classe 1), 37 a 42 kDa (classes 2, 3 ou 4) e 26 a 30 kDa (classe 5) (POLLARD; FRASCH, 2001).

De acordo com as diferenças imunológicas dessas classes, pode-se realizar a classificação desta bactéria em sorotipo e subtipo (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985; REQUEJO, 2005).

As proteínas de classe 1 são porinas do tipo A (PorA) e são empregadas na definição do subtipo, já as de classe 2 e 3, são porinas do tipo B (PorB) que são empregadas na definição dos sorotipos. Todas as cepas de meningococos expressam a proteína de classe 2 ou 3, mas nunca ambas simultaneamente (ABDILLAHI; POOLMAN, 1988).

A identificação descritiva de uma cepa do meningococo se faz pela sequência Sorogrupo: Sorotipo: Subtipo, designada fórmula antigênica (FRASCH; ZOLLINGER; POOLMAN, 1985). Por exemplo, a denominação B:4:P1.9 de *N. meningitidis* indica que esta bactéria pertence ao sorogrupo B, sorotipo 4 e subtipo P1.9 (DE GASPARI; ZOLLINGER, 2001).

Os sorogrupos e sorotipos permitem a identificação das cepas em situações endêmicas e epidêmicas, de tal modo, a combinação de classificações de sorogrupos, sorotipos e subtipos podem fornecer informações suficientes para acompanhar a propagação de cepas dentro e entre países, o que é necessário para a vigilância das doenças meningocócicas, além de ajudar na identificação de antígenos relacionados com infecções (ABDILLAHI; POOLMAN, 1988).

1.2 Fatores de Virulência

Para ser capaz de colonizar, sobreviver na corrente sanguínea e se espalhar, a bactéria pode usar estratégias diferentes para escapar do sistema imunológico e se adaptar a diferentes ambientes. Assim, os principais componentes da membrana externa (polissacarídeo capsular, OMPs e LPS/LOS) estão relacionados com a virulência meningocócica (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

A cápsula é o principal fator de virulência do meningococo e sua expressão sofre regulação genética durante a patogênese. Durante a adesão celular e a formação do biofilme, a expressão da cápsula é regulada negativamente ou perdida. Por outro lado, a cápsula é importante para a sobrevivência no sangue e é consequentemente regulada positivamente durante a invasão na corrente sanguínea (PIZZA; RAPPUOLI, 2015).

Os polissacarídeos capsulares ajudam, portanto na transmissão e colonização, ademais também podem exercer um papel importante na proteção da bactéria contra a dessecação, fagocitose, opsonização e atividade bactericida mediada pelo complemento (QUAGLIARELLO, 2011; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

Entre as OMPs, os pili do tipo IV são estruturas comuns a muitas bactérias patogênicas. Essas organelas se estendem vários milímetros (mm) da superfície celular, e assim, facilitam a ligação inicial dos meningococos às células hospedeiras e estão associadas com a chamada motilidade espasmódica, que é importante para a passagem através da camada de muco e movimento sobre as superfícies epiteliais (QUAGLIARELLO, 2011; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

A bactéria também apresenta outras proteínas de membrana externa importantes no processo de virulência. As proteínas de opacidade, pertencentes à classe 5 das proteínas, facilitam as interações com a bactéria e as células epiteliais e endoteliais, auxiliando na adesão. Estas proteínas são expressas de forma variável, dependendo do ambiente, o que permite que a bactéria se adapte rapidamente a mudanças nas condições ambientais (QUAGLIARELLO, 2011).

Outro fator de virulência importante encontrado na membrana externa são os LOS, estruturas análogas ao LPS de bactérias entéricas Gram-negativas, que contém em sua estrutura uma porção com atividade de endotoxina, o que promove a sepse sistêmica encontrada clinicamente, além de possuir papel na adesão e colonização (QUAGLIARELLO, 2011; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

1.3 Transmissão, Patogenicidade e Manifestações clínicas da infecção por *N. meningitidis*

Em geral, a disseminação do meningococo ocorre de pessoa para pessoa e pode resultar em epidemias comunitárias de meningite bacteriana, com consequências importantes para a saúde (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

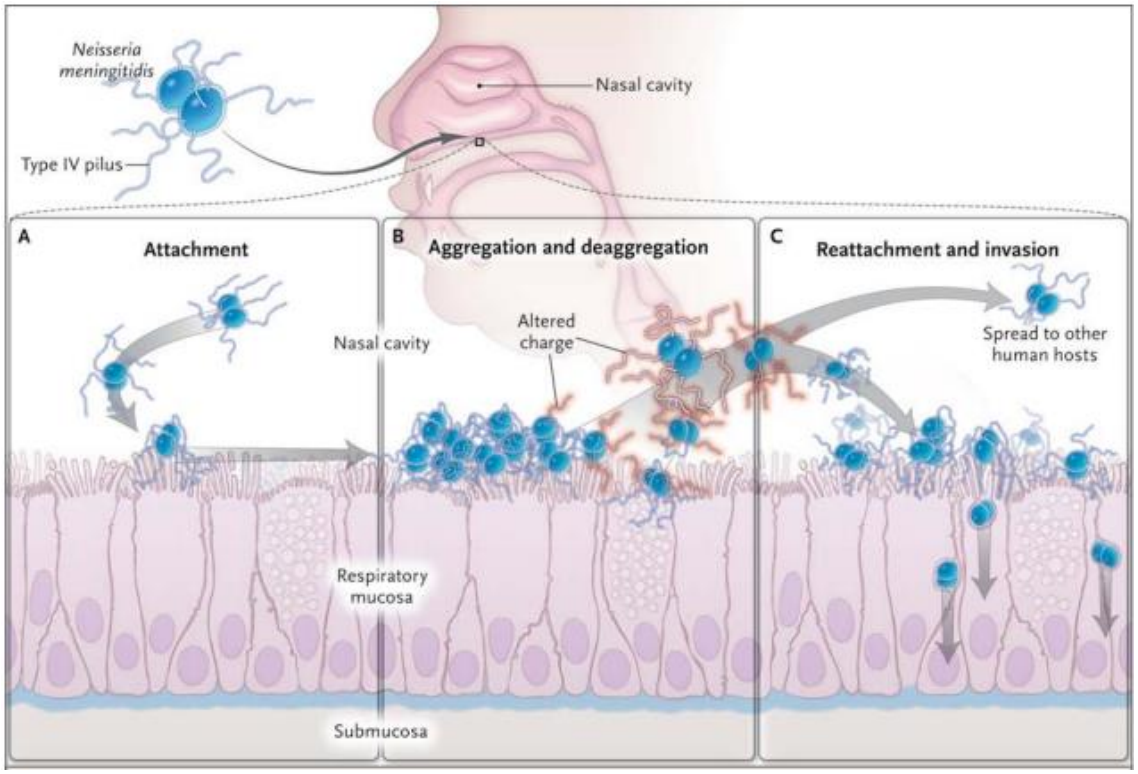
Como patógeno humano obrigatório, *N. meningitidis* deve realizar uma colonização eficiente para conseguir se desenvolver. A figura 1 demonstra o processo de colonização da bactéria no organismo humano. Assim que a bactéria entra em contato com o hospedeiro, ela inicialmente se adere às células epiteliais da nasofaringe e para isso, conta com proteínas filamentosas, chamadas de pili do tipo IV, que também estão relacionadas com muitos estágios do processo infeccioso e são responsáveis pela adesão a receptores específicos de mucosa (PIZZA; RAPPUOLI, 2015).

Após a adesão, inicia-se a fase de proliferação na qual este microrganismo consegue se multiplicar. *N. meningitidis* induz a formação de protrusões na membrana plasmática do hospedeiro, e com isso ocorre a agregação da bactéria em microcolônias, além de facilitar o contato mediado pelos pili entre as células bacterianas e as células do hospedeiro (QUAGLIARELLO, 2011).

Chamot-Rooke et al., 2011 observaram que após quatro horas do contato entre a bactéria e as células do hospedeiro, os pili sofrem uma modificação pós-traducional, o que altera a carga dos pili e por consequência faz com que o meningococo se desagregue das microcolônias para invadir sistematicamente o hospedeiro, por meio de uma via transcelular

que cruza o epitélio respiratório e chega à corrente sanguínea, no caso da infecção invasiva, ou ainda, pode se tornar aerossolizado e se disseminar realizando a colonização de novos hospedeiros.

Figura 1 – Adesão, proliferação e disseminação de *N. meningitidis* no hospedeiro.



Legenda – (A) Adesão. A colonização por *N. meningitidis* tem inicio com a adesão da bactérias ás células da mucosa respiratória, este processo é facilitado pelos pili do tipo IV. (B) Agregação e Desagregação. Após a adesão, ocorre a multiplicação de *N. meningitidis* que então se agrega, porém em 4 horas os pili sofre uma modificação pós-traducional, que altera a carga dos pili e por consequência faz com que o meningococo se desagregue das microcolônias (C) Readesão e Invasão. A bactéria pode então aderir novamente as células epiteliais da mucosa respiratória, passar por disseminação sistêmica ou ainda, pode torna-se aerossolizado e colonizar novos hospedeiros.

Fonte - QUAGLIARELLO, 2011.

O contágio ocorre por meio do contato próximo do indivíduo saudável com secreções respiratórias ou saliva do indivíduo que carrega o meningococo e o período de incubação geralmente ocorre dentro de 1-14 dias após aquisição. Esta aquisição pode ser transitória, levar à colonização sem causar a doença (portador assintomático), ou resultar em doença invasiva. Além disso, diversos fatores ambientais, como a exposição à fumaça de cigarro, podem causar inflamação da superfície da mucosa nasofaríngea, o que também tem sido

associado com risco aumentado de DMI (BORROW et al., 2017; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

A colonização do microrganismo em portadores assintomáticos leva a imunidade protetora contra o meningococo. Aproximadamente 10% da população humana pode apresentar o trato respiratório superior colonizado por *N. meningitidis* sem apresentar nenhum sintoma (BORROW et al., 2017; PIZZA; RAPPUOLI, 2015). As taxas de portadores assintomáticos aumentam em certas condições e em diferentes idades, com predominância na adolescência e em adultos jovens, mas muito mais baixa em idosos e lactentes (BORROW et al., 2017).

Esta condição pode aumentar especialmente quando há agrupamentos de pessoas, como na faculdade e em ambiente militar, porém esta colonização pode servir como porta de entrada para a corrente sanguínea, causando septicemia, e em seguida para o cérebro, resultando em um quadro de meningite bacteriana (CHAMOT-ROOKE et al., 2011; PIZZA; RAPPUOLI, 2015). Os meningococos podem também se espalhar da nasofaringe para as células epiteliais adjacentes e ainda, mesmo que raro, causar infecções locais, incluindo pneumonia, sinusite ou otite (STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

A meningite bacteriana é o principal quadro relacionado à *N. meningitidis*, e seus sinais e sintomas incluem febre alta que começa abruptamente, dor de cabeça intensa e contínua, vômito, náuseas, rigidez de nuca e manchas vermelhas na pele (petéquias), em crianças menores de um ano de idade os sintomas referidos acima podem não ser tão evidentes e, portanto a presença de moleira tensa ou elevada, irritabilidade, inquietação com choro agudo e persistente e rigidez corporal com ou sem convulsões podem ajudar no diagnóstico (BOSIS; MAYER; ESPOSITO, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O diagnóstico rápido da infecção meningocócica, além do tratamento inicial agressivo é importante para a redução da mortalidade. Os antibióticos cefotaxima, ceftriaxona e penicilina são os antibióticos de escolha para terapia inicial em pacientes com diagnóstico clínico de DMI. Junto ao uso de penicilina, deve-se fazer o tratamento de seguimento com ceftriaxona, ciprofloxacino ou Rifampicina, que é necessário para eliminar o transporte nasofaríngeo. O cloranfenicol e o meropenem podem ser utilizados em casos de alergia à penicilina (NADEL, 2016).

Ademais, todos os indivíduos que estejam em contato próximo com um indivíduo infectado pelo DMI devem receber a quimioprofilaxia, independentemente se foram ou não vacinados contra o meningococo. Nestes casos, costuma-se utilizar antibióticos como a rifampicina, ceftriaxona, ciprofloxacino e azitromicina (NADEL, 2016).

1.4 Epidemiologia

O médico Gaspard Vieusseux, relatou a primeira observação de *N. meningitidis* e descreveu clinicamente a DMI, durante a epidemia de Genebra em 1805, na qual, este surto resultou em 33 mortes. Em 1887, Anton Weichselbaum conseguiu isolar esta bactéria pela primeira vez em Viena, nomeando-a *Diplococcus intracellularis meningitidis*, o isolamento foi realizado a partir de amostras *post-mortem* coletadas do líquido cefalorraquidiano de seis pacientes (SAVONA-VENTURA, 1994).

Somente em 1896, a descoberta de Weichselbaum foi confirmada, quando Jaeger observou diplococos similares em 12 casos de meningite de Stuttgart, e assim os conceitos básicos relacionados à bacteriologia da meningite foram aceitos (SAVONA-VENTURA, 1994).

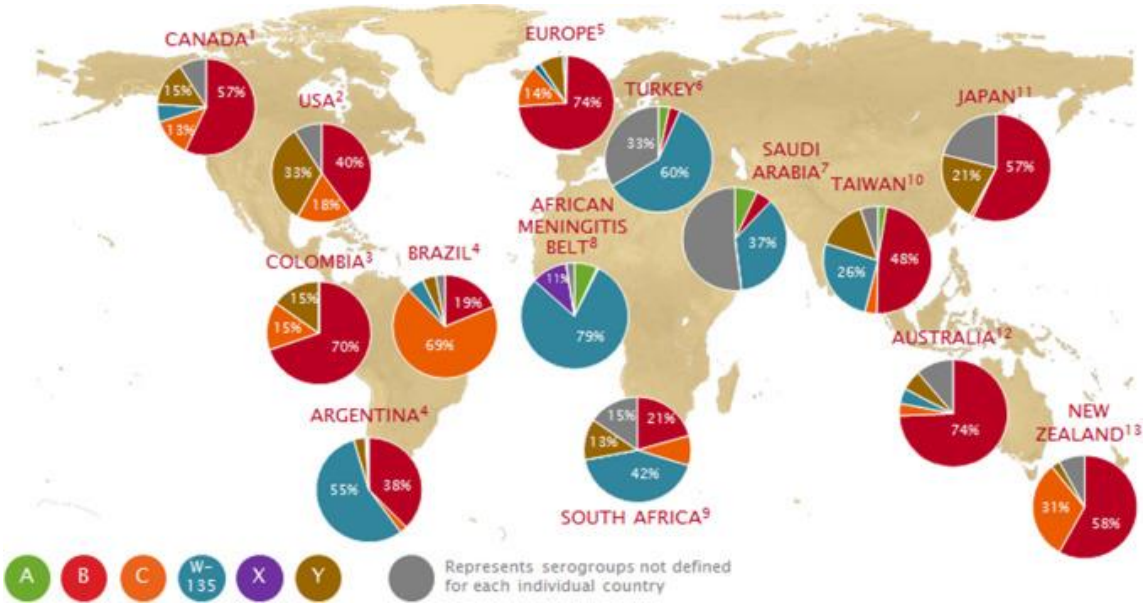
A infecção por *N. meningitidis* é um problema de saúde pública global que é responsável por quadros endêmicos ou epidêmicos. A DMI ocorre no mundo todo, embora as epidemias sejam mais frequentes nos países em desenvolvimento que nos desenvolvidos (BOSIS; MAYER; ESPOSITO, 2015; FERNANDES et al., 2007).

Esta doença pode causar óbito em poucas horas em um indivíduo que até então era considerado saudável, sendo fatal em cerca de 50-80% dos casos não tratados, porém mesmo em indivíduos tratados as taxas de letalidade são de aproximadamente 10-15%. Ademais, esta doença causa grande morbidade, com 12-20% dos sobreviventes sofrendo sequelas clínicas significativas, como por exemplo, paralisia, surdez, deficiência mental, amputações e convulsões (BORROW et al., 2017; FERNANDES et al., 2007).

A incidência geográfica e a distribuição pelo mundo variam de acordo com o sorogrupo, como é mostrada na figura 2, deste modo, a incidência desta doença está entre 0,5 e 1.000 casos / 100.000 habitantes (hab) dependendo da área epidemiológica, embora seja uma doença que afeta indivíduos de todas as idades, as maiores taxas de doença são em lactentes menores de 1 ano de idade, porém picos de incidência também podem ocorrer em adolescentes e idosos (BORROW et al., 2017; PIZZA; RAPPUOLI, 2015).

Dentre os sorogrupos, o sorogrupo B está associado a epidemias de longa duração, com altas taxas de morbidade e mortalidade, enquanto que o sorogrupo C tem causado surtos e epidemias, além de estar relacionado a aumento da incidência dos casos de DMI em adolescentes e adultos jovens (FERNANDES et al., 2007).

Figura 2 – Distribuição global dos sorogrupos meningocócicos.



Legenda – O gráfico mostra a distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* em diferentes regiões do mundo. (A) Sorogrupo A, representado em verde; (B) Sorogrupo B, representado em vermelho; (C) Sorogrupo C, representado em laranja; (W-135) Sorogrupo W, representado em azul; (X) Sorogrupo X, representado em roxo, (Y) Sorogrupo Y representado em marrom. Os sorogrupos que não puderam ser definidos estão representados no gráfico em cinza.

Fonte - OVIEDO-ORTA et al., 2015.

Uma das regiões geográficas com maior incidência de DMI no mundo é a África Subsaariana, também conhecida como “Cinturão africano da meningite”, que se estende desde o Senegal até a Etiópia, sendo composta por 13 países. Esta região é caracterizada por surtos anuais de DMI durante a estação de secas e grandes epidemias emergem em média a cada 8-10 anos, a incidência destes surtos é de até 1.000 casos/ 100.000 hab ao ano, 200 vezes maior do que a incidência em outras áreas do mundo (CAUGANT et al., 2012; OVIEDO-ORTA et al., 2015). Por muito tempo o sorogrupo A foi responsável pela maior parte da doença endêmica, bem como pelas grandes epidemias, porém recentemente os sorogrupos W e X também tem sido relacionados a casos da doença (BOSIS; MAYER; ESPOSITO, 2015; CAUGANT et al., 2012).

A epidemia mais grave que ocorreu na África foi em 1996 causada pelo sorogrupo A, com mais de 150.000 casos notificados e 16.000 mortes. Em 2002, o país Burkina Faso, foi o primeiro país da região a sofrer uma epidemia grave de sorogrupo W, com 13.000 casos notificados e 1.400 mortes. Assim, a vacina monovalente MenAfriVac® (Serum Institute of

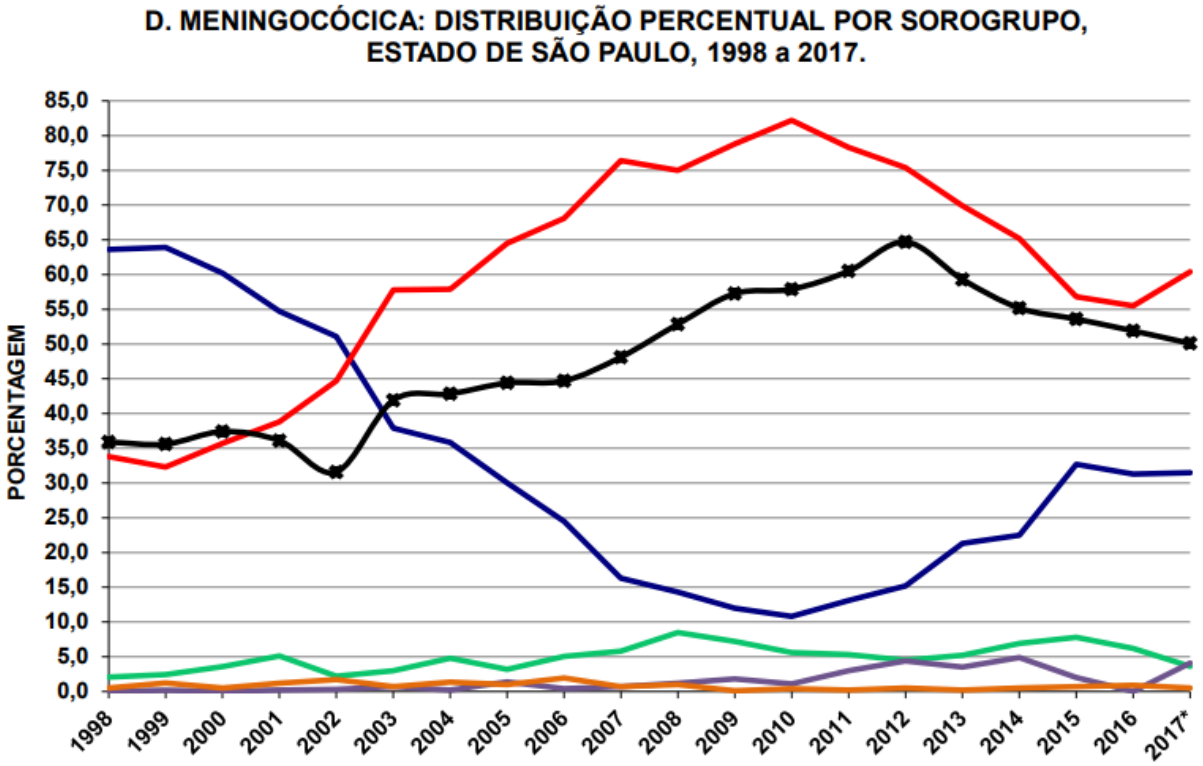
India Ltd., Pune, India) contra o sorogrupo A começou a ser distribuída em 2002 para tentar conter os surtos e resultou na diminuição dos casos desde então (CAUGANT et al., 2012).

Outros surtos de destaque também ocorreram pelo mundo, como o surto da Nova Zelândia causado por uma cepa B:4:P1.7-2.4, que apresentou um aumento rápido no número de casos, cerca de 86% entre 1990 e 2003, no qual o pico de casos notificados foi em 2001, com 10 casos/100.000 hab. ao ano; Na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA), o sorogrupo A era o principal causador da DMI até os anos 1950, no entanto após o último surto descrito na Finlândia em meados da década de 1970, sua incidência diminuiu muito e hoje o principal sorogrupo encontrado nos casos notificados é o sorogrupo B; Em 2013, surtos de MenB ocorreram em duas universidades nos Estados Unidos da América (Princeton, NJ, e Universidade da Califórnia, Santa Barbara) mas foram contidos pelo uso da vacina Bexsero® (GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgium) (BORROW et al., 2017; OVIEDO-ORTA et al., 2015).

No Brasil, a primeira epidemia de DMI ocorreu em 1920, na qual o sorogrupo C foi responsável por 50% dos casos e o sorogrupo A responsável por aproximadamente 25% dos casos (MORAES; BARATA; 2005). Atualmente o meningococo do sorogrupo C (MenC) continua sendo a causa mais comum de doença, porém desde a introdução da vacina MenC no Brasil em 2010, houve uma redução imediata das taxas de incidência de DMI, especialmente nas crianças alvo de vacinação. Embora as vacinas polissacarídicas ofereçam proteção contra a doença, estas não impediram a aquisição do transporte assintomático de MenC nos surtos de 2010 e, portanto, recomenda-se o uso das vacinas conjugadas para controlar surtos, uma vez que essas também impedem que indivíduos se tornem transportadores do meningococo (BORROW et al., 2017).

No Estado de São Paulo, o sorogrupo C também é responsável pela maioria dos casos, assim como no país em geral, todavia, dados recentes do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo (Figura 3), mostram que de 2010 a 2016 houve uma diminuição de sua incidência, com um aumento em 2017, enquanto que, a taxa de incidência da DMI causada pelo sorogrupo B se manteve entre 2016 e 2017 (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2017).

Figura 3 – Distribuição percentual da doença meningocócica por sorogrupo no Estado de São Paulo entre 1998 e 2017.

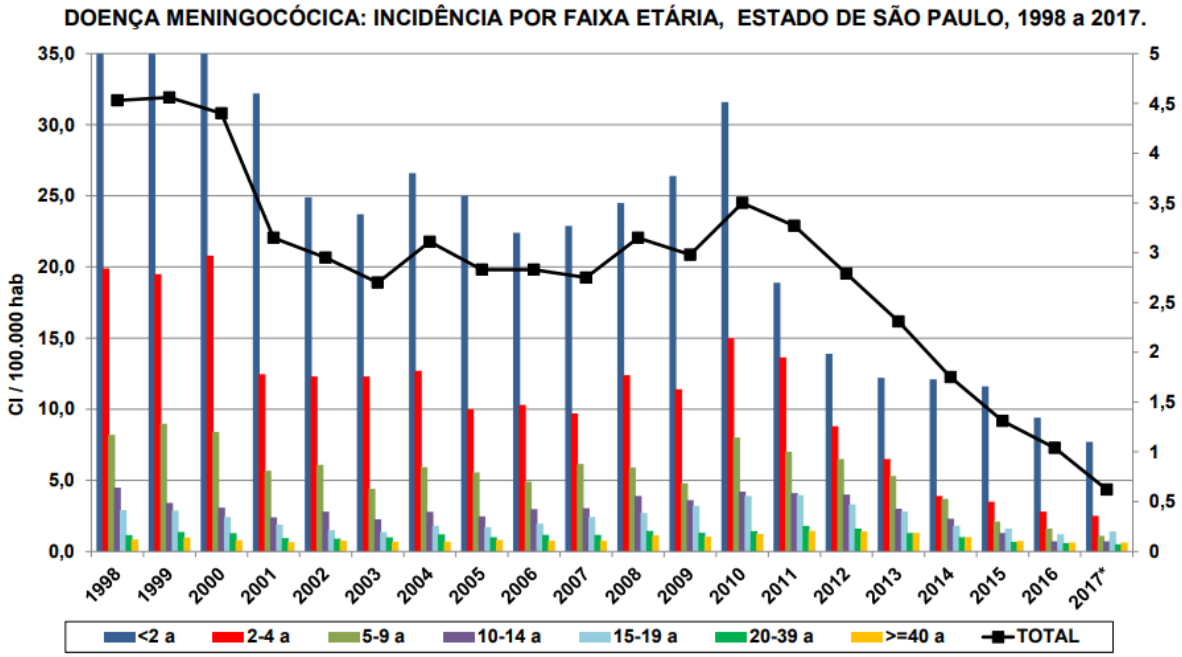


Legenda – O gráfico, que foi atualizado em 26 de dezembro de 2017 pelo Centro de Vigilância Epidemiológica, mostra a distribuição percentual dos sorogrupos de *N. meningitidis* no período de 1998 a 2017 em São Paulo. As linhas representam os diferentes sorogrupos: Azul (Sorogrupo B); Vermelho (Sorogrupo C); Verde (Sorogrupo W); Roxo (Sorogrupo Y); Laranja (Outros Sorogrupos); Preto (Sorogrupagem). É possível observar que até o momento o sorogrupo C apresenta o maior percentual de casos no Estado de São Paulo até o momento e que o porcentual de casos por Sorogrupo B se manteve entre 2016 e 2017.

Fonte - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2017

Também de acordo com o CVE do Estado de São Paulo, apesar da incidência da DMI ter diminuído a partir de 2010, o grupo que apresenta o maior risco de adquirir a infecção são as crianças menores de 2 anos de idade, seguido por crianças de 2 a 4 anos, como é demonstrado na Figura 4 (CVE, 2017).

Figura 4 – Incidência da doença meningocócica por faixa etária no Estado de São Paulo entre 1998 a 2017.



Legenda – O gráfico, que foi atualizado em 26 de dezembro de 2017 pelo Centro de Vigilância Sanitária, mostra a incidência da doença meningocócica por faixa etária no período de 1998 a 2017 no estado de São Paulo, no qual cada faixa etária está sendo representada por uma cor. É possível observar que a incidência da doença meningocócica diminuiu, no entanto, a faixa etária de crianças menores de 2 anos ainda é a mais prevalente em 2017.

Fonte – CVE, 2017.

O reconhecimento precoce de crianças com infecção meningocócica é importante, para que se inicie rapidamente a terapia antibiótica sistêmica, embora a vacinação continue a ser a melhor estratégia para controlar a doença meningocócica (BOSIS; MAYER; ESPOSITO, 2015).

1.5 Vacinação

A vacinação ainda é o método chave para a prevenção de muitas doenças, portanto várias vacinas e estratégias vacinais tem sido desenvolvidas, tendo como principal objetivo proteger os vacinados quando estes forem expostos ao patógeno, bem como reduzir a aquisição e o transporte, particularmente de isolados hiperinvasivos, e a subsequente transmissão (BORROW et al., 2017).

Fatores como sexo, hormônios sexuais e fatores ambientais podem interferir na resposta imune frente à vacinação. Está descrito na literatura que indivíduos do sexo feminino apresentam uma resposta inata, humoral e celular maior e mais prolongada do que indivíduos do sexo masculino, tornando-as mais resistentes a infecções, no entanto a administração de vacinas costuma ser realizada da mesma maneira entre ambos os sexos (RUGGIERI et al., 2016).

Com o passar dos anos e os avanços tecnológicos, diversas vacinas foram desenvolvidas para conter a DMI, a tabela 1 mostra algumas das vacinas mais utilizadas contra os sorogrupos.

Tabela 1 – Principais vacinas disponíveis contra a doença meningocócica e seus fabricantes.

Vacina	Cobertura (Sorogrupos de *N. meningitidis)*	Fabricantes
	Vacinas Polissacarídicas	
Várias	Um ou mais sorogrupos A, C, W e/ou Y	Vários (Disponível à mais de 40 anos)
	Vacinas Conjugadas com Proteínas	
Meningitec®	C	Nuron Biotch Inc. Exton, PA, USA
Menjugate®	C	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgium
NeisVac-C®	C	Pfizer Inc., New York, NY, USA
MenAfriVac®	A	Serum Institute of India Ltd., Pune, India
Menactra®	A, C, W, Y	Sanofi Pasteur SA, Lyon, France
Menveo®	A, C, W, Y	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgium
Nimenrix®	A, C, W, Y	Pfizer Inc., New York, NY, USA
	Vacinas Conjugadas Combinadas	
Menitorix®	C + *Haemophilus influenzae* tipo B	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgium
MenHibrix®	C, Y + *Haemophilus influenzae* tipo B	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgium
	Vacinas de Antígeno Meningocócico Subcapsular	
Trumenba®	B	Wyeth Pharmaceuticals Inc., Filadelfia, FA, USA.

Bexsero®	B	GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rixensart, Belgium

Fonte - BORROW et al., 2017.

Atualmente o Calendário Nacional de Vacinação, que está disponível no site do Ministério da saúde, contém uma vacina contra a DMI (Tabela 2). A vacina MenC conjugada está disponível na rede pública desde final de 2010, e deve ser administrada a partir do terceiro mês de vida criança, com uma segunda dose aos 5 meses e uma dose reforço aos 12 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Neste programa de vacinação, o Ministério da Saúde recomenda administrar uma dose da vacina meningocócica C em crianças entre 2 e 4 anos que não tenham recebido o reforço ou que tenham perdido a oportunidade de se vacinar anteriormente. A vacina conjugada também passou a ser oferecida em 2017 para adolescentes de 12 a 13 anos no sistema público de saúde e esta faixa-etária será ampliada gradativamente até 2020, quando serão incluídos crianças e adolescentes com 9 anos até 13 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Tabela 2 - Calendário Nacional de Vacinação de 2017.

Idade	Vacinas
Ao nascer	– BCG
	– Hepatite B
2 meses	– Pentavalente 1ª dose (Tetravalente + Hepatite B 2ª dose)
	– Poliomielite 1ª dose (VIP)
	– Pneumocócica conjugada 1ª dose
	– Rotavírus 1ª dose
3 meses	– Meningocócica C conjugada 1ª dose
4 meses	– Pentavalente 2ª dose (Tetravalente + Hepatite B 3ª dose)
	– Poliomielite 2ª dose (VIP)
	– Pneumocócica conjugada 2ª dose
	– Rotavírus 2ª dose
5 meses	– Meningocócica C conjugada 2ª dose
6 meses	– Pentavalente 3ª dose (Tetravalente + Hepatite B 4ª dose)
	– Poliomielite 3ª dose (VIP)
9 meses	– Febre Amarela
12 meses	– Pneumocócica conjugada reforço
	– Meningocócica C conjugada reforço
	– Tríplice Viral 1ª dose
15 meses	– DTP 1º reforço (incluída na pentavalente)

	– Poliomielite 1º reforço (VOP) – Hepatite A (1 dose de 15 meses até 5 anos) – Tetra viral (Tríplice Viral 2ª dose + Varicela)
4 anos	– DTP 2º reforço (incluída na pentavalente) – Poliomielite 2º reforço (VOP) – Febre amarela reforço
9-14 anos	– HPV 2 doses – Meningocócica C (reforço ou dose única com 12-13 anos)
Adolescentes, Adultos e Idosos	– Hepatite B (3 doses a depender da situação vacinal) – Febre Amarela (1 dose a cada 10 anos) – Tríplice Viral (2 doses até os 29 anos ou 1 dose em > 30 anos. Idade máxima: 49 anos) – DT (Reforço a cada 10 anos) – dTpa (para gestantes a partir da 20ª semana, que perderam a oportunidade de serem vacinadas)

Fonte - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017.

1.5.1 Vacinas contra o meningococo sorogrupo B

A proteção contra *N. meningitidis* depende principalmente da produção de anticorpos, no geral, daqueles que apresentam atividade bactericida. Matsunami e Kolmer (1918) utilizaram um ensaio bactericida para mostrar que anticorpos bactericidas do sangue de vários animais estavam relacionados com a resistência à infecção com *N. meningitidis*. Mais tarde, foi visto que o ensaio de atividade bactericida está relacionado com o ensaio de avidez de anticorpos anti-*N. meningitidis*, sendo um ensaio de fácil padronização, além de não ser tão laborioso, deste modo as vacinas contra o meningococo buscam a proteção por meio de anticorpos bactericidas e com alta avidez (GRANOFF et al., 1998).

O sorogrupo B apresenta polissacarídeos em sua cápsula que são pouco imunogênicos uma vez que sua estrutura apresenta homologia ao ácido polisiálico, que está presente em muitas glicoproteínas humanas, incluindo as das células neuronais humanas e, portanto, não pode ser utilizado como antígeno vacinal, pois os anticorpos anticapsulares produzidos poderiam cruzar com os antígenos do indivíduo vacinado e resultar em uma resposta autoimune (HARRIS et al., 2017; SADARANGANI; POLLARD, 2010; STEPHENS; GREENWOOD; BRANDTZAEG, 2007).

Assim, as primeiras vacinas de proteínas de membrana externa começaram a ser testadas na década de 1970 e foram imunogênicas em animais, mas não provocaram anticorpos bactericidas séricos em seres humanos, este fato levou ao desenvolvimento de

vacinas de proteínas solúveis na forma de OMVs. Estas estruturas são semelhantes às OMVs liberadas naturalmente por *N. meningitidis* durante a cultura e infecção e contêm OMPs, proteínas periplasmáticas e fosfolipídios, porém apresentam LOS em quantidade reduzida (SADARANGANI; POLLARD, 2010).

As OMVs tem sido usadas no controle de surtos contra cepas específicas desde a década de 1980, estas apresentam eficácia clínica contra o sorogrupo B com antígenos homólogos e anticorpos bactericidas em adultos, porém não são tão eficientes em crianças menores de 6 anos e contra cepas que expressam antígenos heterólogos (HARRIS et al., 2017; PIZZA; RAPPUOLI, 2015; SADARANGANI; POLLARD, 2010). Portanto, o desenho de uma vacina contra o meningococo B enfrenta inúmeros desafios e para tentar contorna-los, busca-se uma vacina contra o meningococo do sorogrupo B (MenB) baseada em proteínas conservadas que contenham OMVs de forma que esta possa gerar uma proteção contra cepas endêmicas e epidêmicas de MenB (HARRIS et al., 2017; PIZZA; RAPPUOLI, 2015).

A primeira vacina MenB altamente eficaz a ser desenvolvida foi a vacina cubana VA-MENGOC-BC® (Instituto Finlay, Habana, Cuba), esta apresentou eficácia de 83% e após uma campanha de vacinação em massa, a incidência de doença meningocócica invasiva em Cuba caiu de um pico de 14,4/100.000 hab. ao ano em 1983 para 0,8/100.000 hab. ao ano em 1993-94. No Brasil, esta vacina apresentou eficácia de 70-74% em crianças de 4-9 anos de idade, porém a vacina foi ineficaz em crianças mais jovens (SADARANGANI; POLLARD, 2010).

A vacina da Nova Zelândia foi a segunda a ser licenciada para o sorogrupo B. A partir de 1991, o país sofreu uma epidemia de DMI com pico em 2001, sendo que esta epidemia foi causada principalmente pela cepa B:4:P1.7-2,4, que foi utilizada para o desenvolvimento da vacina. Esta apresentou eficácia em 53% dos lactentes jovens (6-8 semanas), 74-76% dos idosos e crianças de 6 meses a 12 anos, e 96% dos adultos, porém foi visto uma diminuição substancial da imunidade a longo prazo com apenas 3-34% das crianças com idade entre 6 semanas e 24 meses, mantendo resposta por 4-16 meses após a terceira dose, sendo necessário múltiplas doses para uma resposta mais persistente (SADARANGANI; POLLARD, 2010).

Atualmente, o desenvolvimento de novas vacinas contra o sorogrupo B tem utilizado com base outros antígenos subcapsulares e a inclusão de múltiplos antígenos reduz o risco de escape das variantes, o que poderia ocorrer com vacinas que são fabricadas a partir de um único antígeno, devido ao fato de *N. meningitidis* apresentar alta taxa de variação de fase, recombinação e mutação de seu genoma (SADARANGANI; POLLARD, 2010).

A diversidade antigênica das proteínas de superfície meningocócicas tem sido uma das principais limitações no desenho de vacinas meningocócicas amplamente protetoras e novas abordagens têm sido adotadas. São elas: Vacinologia Reversa, que é baseada na identificação de múltiplos antígenos e resultou no desenvolvimento da vacina Bexsero® (também chamada 4CMenB) licenciada até agora em países como Portugal, Itália, Reino Unido, Alemanha, Áustria, Espanha, Grécia, Irlanda, Polônia, República Checa, Hungria, França, Estados Unidos, Austrália, Canadá, Brasil e Chile; A outra abordagem é baseada na combinação de duas variantes recombinantes da proteína de ligação do fator H (fHBP) lipidadas de *N. meningitidis* sorogrupo B, uma da subfamília A da fHBP e uma da subfamília B (A05 eB01), respectivamente (chamada Trumenba) e ambas as abordagens parecem ser promissoras (PIZZA; RAPPUOLI, 2015).

1.5.2 Adjuvantes

Muitas vacinas são baseadas em vírus e bactérias vivas atenuadas ou mortas e apesar de efetivas, essas vacinas costumam causar diversos efeitos adversos como febre, erupções cutâneas, inchaço e em alguns casos até infecções derivadas de vacinas. Tendo em vista este problema, novas estratégias vacinais envolvem o desenvolvimento de vacinas nas quais apenas partes do microrganismo são incluídas, sendo chamadas de vacinas de subunidades (CHRISTENSEN, 2016).

Essas novas formulações produzem menos efeitos adversos, porém são menos imunogênicas e consequentemente menos efetivas, sendo necessário o uso de adjuvantes, para aumentar a imunogenicidade dessas vacinas e assim induzir uma resposta imune protetora e duradoura (CHRISTENSEN, 2016; REED et al., 2009).

Os adjuvantes são moléculas, compostos ou complexos macromoleculares que aumentam a potência e a longevidade da resposta imune específica aos antígenos, normalmente por meio da indução de uma inflamação controlada, causando toxicidade mínima. Sua adição às vacinas aumenta, sustenta e dirige a imunogenicidade de antígenos, modulando de forma eficaz as respostas imunes, reduzindo a quantidade de antígeno ou número de imunizações necessárias e melhorando a eficácia de vacinas em recém-nascidos, idosos ou indivíduos imunocomprometidos, porém devem ser formulados de forma adequada para apresentar a eficácia necessária e não apresentar efeitos adversos tóxicos (REED et al., 2009).

Os adjuvantes tem sido estudados desde 1925, quando Gaston Ramon observou que adicionando certas substâncias (como farinha de tapioca, lecitina, ágar, saponina, pão ralado) ao toxóide diftérico a resposta imune era aumentada. Alexander T. Glenny demonstrou em 1926 que o toxóide diftérico precipitado com sais de alumínio aumentava significativamente a resposta ao toxóide e então durante a década de 1930 os sais de alumínio foram usados pela primeira vez como adjuvantes (CHRISTENSEN, 2016).

O hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$), um dos sais de alumínio que é amplamente utilizado, foi por aproximadamente 60 anos o único adjuvante licenciado para humanos, mas a partir de 1990 novos adjuvantes passaram a ser utilizados, como o MF59 um imuno-potenciador à base de emulsão de esqualeno incluído na Fluad®, virossomas de influenza reconstituídos nas vacinas Epaxal® e Inflexal®, o AS01E e QS-21, um adjuvante lipossomal e saponina imunoestimuladora, respectivamente, presentes na vacina contra a malária Mosquirix®. Atualmente, permanece a busca por novos adjuvantes para induzir a imunidade das células T e a imunidade local nos tecidos da mucosa, que atuam como porta de entrada para muitos patógenos (CHRISTENSEN, 2016).

Apesar do amplo uso de adjuvantes em vacinas, os mecanismos de ação pelos quais estes potenciam as respostas imunes não estão bem caracterizados (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013). Estes compostos utilizam múltiplos mecanismos para promover uma melhor resposta imunológica, que incluem (1) geração de depósitos, que promovem a liberação prolongada de antígenos no local da injeção, (2) regulação positiva de citoquinas e quimiocinas, (3) recrutamento no local da injeção e (4) uma maior apresentação imunológica de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APC) (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; CHRISTENSEN, 2016; REED et al., 2009).

Com base nos seus mecanismos de ação, os adjuvantes podem ser divididos em Imunoestimulantes e Sistemas de Liberação. Em geral, os imunoestimulantes atuam diretamente sobre o sistema imune ativando as células do sistema imune inato, sendo exemplos citoquinas, saponinas e exotoxinas bacterianas que estimulam respostas imunes, já os Sistemas de Liberação atuam providenciando um depósito de antígenos ou também de imunoestimulantes no local da injeção, porém foi visto que alguns Sistemas de Liberação também podem ativar a imunidade inata, sendo exemplos: sais, emulsões, lipossomas, virossomas, micro e nanopartículas, hidrogéis, peptídeos catiônicos e os chamados complexos de estimulação imunológica, como o ISCOM e ISCOMATRIX (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013; CHRISTENSEN, 2016).

O uso de adjuvantes apropriados pode conferir imunidade protetora, portanto um maior conhecimento destes é importante para o desenho racional de vacinas (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013).

1.5.2.1 Hidróxido de Alumínio

O hidróxido de alumínio é um dos adjuvantes mais utilizados em vacinas, uma vez que apresenta histórico de segurança, facilidade de preparação, estabilidade e efeitos imunoestimuladores e embora este adjuvante já esteja em uso a cerca de 90 anos, os seus mecanismos de ação permaneceram indescritíveis. Diversos efeitos induzidos pelo alumínio podem contribuir para o aumento da imunogenicidade das vacinas, no entanto, em muitos casos, estes efeitos são apenas parcialmente descritos ou a relação com a função de adjuvante não é esclarecida (GHIMIRE, 2015).

Até recentemente, acredita-se que as propriedades adjuvantes deste composto estavam ligadas apenas ao efeito de depósito, ou seja, a liberação lenta do antígeno associado a ele. No entanto, foi visto que se o complexo antígeno-adjuvante for removido horas após a imunização, ainda havia resposta imune, demonstrando que o efeito de depósito e liberação lenta do antígeno não foram responsáveis pela sua atividade adjuvante (APOSTÓLICO et al., 2016).

Em um segundo mecanismo proposto, este composto também é capaz de ativar as células imunes inatas, o que resulta em uma resposta imune do tipo T *helper* 2 (Th2). Outra hipótese é que a citotoxicidade do hidróxido de alumínio parece levar à liberação de ácido úrico *in vivo*, o que atua como um padrão molecular associado a dano (DAMP), o que é responsável pela atividade adjuvante deste composto (MARRACK; MCKEE; MUNKS, 2009).

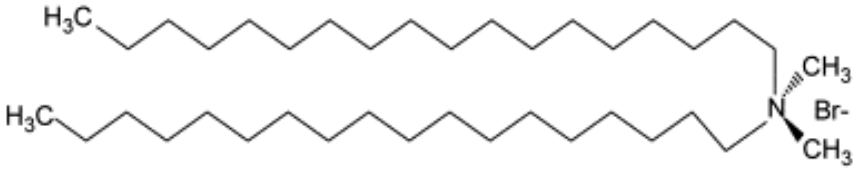
Mesmo com a falta de compreensão exata sobre o modo de ação do hidróxido de alumínio, este permanece como o principal candidato a uso em novas vacinas, assim o estudo do seu mecanismo de ação é importante para o desenvolvimento de futuras vacinas (GHIMIRE, 2015).

1.5.2.2 Brometo de Dioctadecildimetilamônio (DODAB)

O dioctadecildimetilamônio (DDA) foi mencionado pela primeira vez como adjuvante por Gall em 1966. Este é um lípide catiônico, que pertence ao grupo das aminas quaternárias, é carregado positivamente e apresenta um átomo de nitrogênio ligado a dois grupos metil e dois grupos octadecil (CHRISTENSEN et al., 2011; CARMONA-RIBEIRO; CHAIMOVICH, 1983). Sua estrutura química pode apresentar íons cloreto (Cl-) ou brometo (Br-), sendo que não existem indicações de que estes afetam o efeito adjuvante do composto (HILGERS; SNIPPE, 1992).

Com a adição do íon Br- se obtém o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), cuja estrutura química é apresentada na figura 5, um lípide catiônico sintético e barato que devido ao seu caráter anfifílico, é dispersível em água e quando aquecido acima da sua temperatura de transição de fase de gel para líquido (~ 47 ° C) se agrupa formando vesículas em bicamadas ou fragmentos de bicamada, dependendo do método de dispersão que é empregado (LINCOPAN; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 2003).

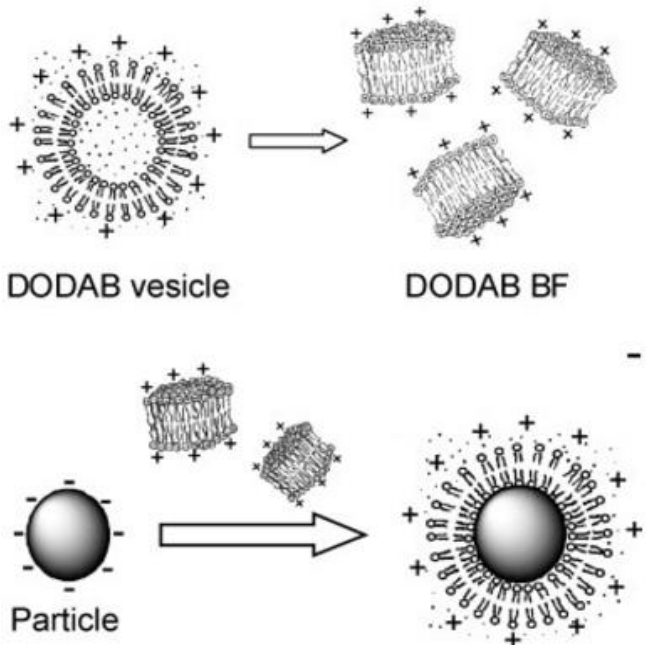
Figura 5: Estrutura química do Brometo de Dioctadecildimetilamônio.



Fonte - SOBRAL; SOTO; CARMONA-RIBEIRO, 2008.

Os fragmentos de bicamada (BF, do inglês *bilayer fragments*) de DODAB (DODAB-BF) são eletrostaticamente estabilizados em dispersão pela repulsão eletrostática entre os fragmentos e já foram previamente utilizados como agentes antimicrobianos ou na produção de partículas revestidas, tais como sílica ou látex revestidos com a bicamada, desta forma o DODAB-BF interage com partículas carregadas negativamente resultando em partículas catiônicas. Na figura 6, podemos observar as estruturas que o DODAB pode assumir de acordo com o método de dispersão que é empregado, resultando em vesículas (esquerda) ou fragmentos de bicamada (direita), assim como a interação com a partícula carregada negativamente, logo abaixo (LINCOPAN et al., 2009).

Figura 6: Estruturas que o DODAB pode assumir de acordo com o método de dispersão empregado.



Legenda - Esquema de formação dos fragmentos de bicamada (BF) de Brometo de Dioctadecildemetilamônio (DODAB) e os complexos DODAB-BF + antígeno.
Fonte - LINCOPAN et al., 2009.

A organização estrutural de DODAB-BF também permite que fármacos hidrofóbicos sejam solubilizados em suas bordas, uma vez essa conformação apresenta bordas mais fluidas, o que não ocorre em sistemas de bicamada fechados tais como vesículas ou lipossomas (LINCOPAN et al., 2009).

Hilgers e Snippe (1992) indicam que preparações vacinais com DODAB, podem ser preparadas simplesmente misturando uma solução de antígeno com uma solução recentemente preparada de DODAB. Eles avaliaram a atividade adjuvante do dioctadecildimetilamônio e observaram que este composto é um indutor forte para respostas imunes do tipo Th1 e Th2, gerando respostas balanceadas. Isso ocorre devido à carga superficial positiva e à capacidade de associação a antígenos que esse lípide catiônico apresenta.

Em comparação ao hidróxido de alumínio, o DODAB exibe maior estabilidade coloidal e melhor eficácia na indução de respostas imunes celulares superiores e tem sido testado como adjuvante junto a antígenos como os de *Candida albicans* (CARNEIRO et al., 2015) e *Neisseria lactamica*, tendo apresentado resultados promissores (GASPAR et al., 2013). Além

disso, o DODAB-BF pode apresentar fragmentos de 200 nm de tamanho, o que representa também um potencial para o uso em vacinas de mucosa (LINCOPAN et al., 2009)

1.6 Imunidade de Mucosa e Adjuvantes

As superfícies mucosas incluem as vias aéreas, cavidade oral, os tratos gastrointestinal e urogenital, conjuntiva ocular e ouvido interno, essas superfícies apresentam uma grande extensão no corpo humano, com mais de 300 m^2 no intestino humano, e são expostos a milhões de antígenos potencialmente nocivos provenientes de bactérias, alimentos e do ambiente (NEURATH; FINOTTO; GLIMCHER, 2002).

Esta estrutura possui um sistema imune inato e adaptativo de mucosa altamente especializado que protege essas superfícies e, portanto, também o interior do organismo, contra possíveis agressões e patógenos do ambiente (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). As glândulas exócrinas são dotadas de poderosos mecanismos mecânicos e químicos de limpeza que degradam e repelem a maioria das matérias estranhas que tentam transpassar as mucosas (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005), além disso, a mucosa forma uma barreira física forte, possui enzimas no lúmen que alteram a natureza do antígeno, células T regulatórias, e também apresenta imunoglobulinas A secretoras (sIgA) (MAYER, 2003).

Em um adulto humano saudável, este sistema imune local contribui com quase 80% de todos os imunócitos. Estas células estão acumuladas, ou em trânsito, entre vários tecidos linfoides associados à mucosas (MALT), os quais, em conjunto, formam o maior sistema de órgãos linfoides de mamíferos (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005).

Uma vez que as mucosas constituem a principal porta de entrada de patógenos, as vacinas administradas pela via de mucosas são potencialmente uma estratégia promissora para combater doenças infecciosas, além de serem vantajosas em relação ao método convencional de vacinação, uma vez que as vacinas injetáveis induzem uma resposta imune de mucosa fraca em contraste da forte resposta imune de mucosa que é necessária nos sítios de entrada de patógenos (NAKAHASHI-OUCHIDA; YUKI; KIYONO, 2017).

Ademais as vacinas de mucosa são de fácil administração, não sendo necessário treinamento extensivo ou habilidades profissionais, podem induzir respostas imunes de mucosas e sistêmicas, podem ser usadas para imunizar populações grandes por causa da eficiência e facilidade do método de administração, não necessitam de agulhas e seringas e, portanto, eliminam a dor, o medo e a ansiedade causados por vacinas injetáveis (NAKAHASHI-OUCHIDA; YUKI; KIYONO, 2017)

No entanto, mesmo com diversas vantagens poucas vacinas de mucosa estão comercialmente disponíveis, sendo apenas duas aprovadas para a imunização pela via intranasal: as vacinas atenuadas quadrivante FluMist® (Medimmune) e trivalente Nasovac™ (Serum Institute of India), utilizadas para a proteção contra a influenza, comercialmente vendidas nos EUA e Asia, respectivamente (BERNOCCHI; CARPENTIER; BETBEDER, 2017). Deste modo, esta via de vacinação ainda não é amplamente utilizada na clínica devido principalmente a problemas como a falta de um adjuvante de mucosa que seja seguro e eficaz (NAKAHASHI-OUCHIDA; YUKI; KIYONO, 2017; TADA et al, 2015).

Os adjuvantes de mucosa podem ser administrados junto a vacinas por via oral ou pela via nasal, promovendo uma resposta sistêmica e local, diminuindo o tempo necessário da resposta imune e aumentando a duração da resposta imunológica (KUMAR; KONG; KOLLS, 2013).

Diversos adjuvantes tem sido avaliados e as nanopartículas tem apresentado bons resultados, uma vez que atuam como sistemas de distribuição e/ou moduladores imunológicos eficientes para aplicações de vacina, protegem antígenos contra a degradação proteolítica e são capazes de contornar o muco da via intranasal, possibilitando assim, uma interação direta com as células da mucosa, desencadeando a resposta imune (BERNOCCHI; CARPENTIER; BETBEDER, 2017).

Além disso, as nanopartículas podem estabelecer uma liberação sustentada do antígeno na mucosa, de modo a melhorar as chances de absorção de antígeno pelas células, o que as tornam boas candidatas para os sistemas de administração para proteínas (BERNOCCHI; CARPENTIER; BETBEDER, 2017).

TADA et al., 2015, avaliaram a administração intranasal de um lípide catiônico junto à ovalbumina (OVA) e puderam observar um potente efeito adjuvante de mucosa em camundongos, com produção de IgA específica para OVA em secreção nasal e níveis aumentados de IgG1 no soro, sugerindo indução de uma resposta imune do tipo Th2. Estes resultados sugerem que os lípides catiônicos merecem maior desenvolvimento como adjuvante de mucosa para a vacinação contra doenças infecciosas.

1.7 Imunização Materno-Fetal

Os neonatos, lactentes e mulheres grávidas são o grupo de maior risco de adquirir doenças infecciosas (GERDTS; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; POTTER, 2016). Mesmo com a transferência de anticorpos via transplacentária, colostro e leite da mãe

para o lactente, muitas vezes os níveis destes anticorpos não são elevados o bastante para garantir a proteção necessária até a imunidade ativa ser desenvolvida na criança, além disso, a imunização em crianças jovens apresenta baixa imunogenicidade, logo a imunização materna tem o potencial de providenciar proteção a mãe e também ao feto e lactente por meio da transferência transplacentária de imunoglobulina G (IgG), e imunoglobulina A (IgGA) por meio do colostro e leite, sendo uma estratégia atraente para aumentar os níveis de imunoglobulinas em neonatos e uma prática que tem sido usada há décadas (OMER, 2017; SWAMY; BEIGI, 2015).

Dentre as vacinas que são recomendadas para gestantes, a vacina meningocócica quadrivalente conjugada (Menactra®) contra os sorogrupos A, C, W e Y é recomendada para grávidas que apresentam fatores de risco (SWAMY; BEIGI, 2015). Esta vacina pode ser aplicada em gestantes no caso de uma indicação específica, assim como a vacina contra o sorogrupo B (Bexsero®). A decisão deve ser baseada em uma avaliação risco-benefício para o paciente, uma vez que poucos dados de estudos clínicos estão disponíveis (OMER, 2017).

Estudos avaliaram a vacina conjugada contra os sorogrupos A e C e também a vacina quadrivalente contra os sorogrupos A, C, W e Y na imunização materna, ambas foram utilizadas para imunização em grávidas no terceiro trimestre e promoveram o aumento de anticorpos nessas mulheres. Os anticorpos foram transferidos para os lactentes por meio da placenta e do aleitamento e se mantiveram circulantes nos primeiros meses de vida dos lactentes (MCCORMICK et al., 1980; O'DEMPSEY et al., 1996; SHAHID et al., 2002).

Em 2016 foi publicado um estudo no qual um grupo de pesquisadores em Mali avaliou de forma randomizada a vacinação em gestantes com a vacina Menactra®, e a vacina Vaxigrip® contra o vírus da influenza, porém os dados sobre eficácia, segurança e imunogenicidade da vacina meningocócica neste ensaio ainda não foram publicados (TAPIA et al., 2016).

As principais preocupações com a imunização materna são a segurança do feto, bem como a possível interferência das vacinas na primeira infância, e por esse motivo costuma-se recomendar a imunização maternal principalmente durante o último trimestre da gravidez. Outro ponto importante de preocupação é a escolha do adjuvante e o impacto que este poderia ter sobre o sistema imunológico materno e consequentemente em sua interação com o sistema imune fetal (GERDTS; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; POTTER, 2016).

Durante a gravidez, o sistema imune materno é regulado, de forma que as células T citotóxicas maternas são reduzidas, pois caso contrário, estas poderiam atacar as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility*

complex) paternas que são expressas localmente em células fetais. Outras modificações na resposta imune como a expressão de citocinas, quimiocinas, além do receptor Fc neonatal ocorrem e facilitam a transferência de grandes quantidades de anticorpos através da placenta (LEVY, 2007).

Esse equilíbrio de citocinas na placenta pode ser afetado pela utilização de adjuvantes na vacinação maternal, o que poderia levar a uma supressão inadequada de linfócitos T citotóxicos e ataques subsequentes durante o desenvolvimento do feto. Além disso, como as citocinas são encontradas em altas concentrações no colostro e no início do leite, estas também poderiam afetar o desenvolvimento precoce do tecido linfoide associado à mucosa, principalmente o intestino, no qual a homeostase depende de um ambiente Th2 (GERDTS; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; POTTER, 2016).

Até o momento os adjuvantes que induzem respostas balanceadas ou do tipo Th2 parecem não oferecer riscos para a imunização materna, porém, uma investigação adequada é importante para compreender claramente o mecanismo de ação dos adjuvantes para este tipo de imunização e principalmente avaliar sua segurança para o uso (GERDTS; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK; POTTER, 2016).

Assim, estudos iniciais utilizando modelos animais, como camundongos, costumam ser muito utilizados e são importantes para uma melhor compreensão dos efeitos que as vacinas podem gerar (JAMESON; MASOPUST, 2017).

Encontram-se disponíveis na literatura vários estudos em modelo animal avaliando diversos tipos de preparações antigênicas para imunização materno-fetal contra muitos patógenos diferentes. Dentre estes estudos, Marruggi et al., 2017 avaliaram uma vacina baseada em mRNA para vacinação materna, que demonstrou ser protetora contra bactérias *Streptococcus* Grupo A e B em ensaio pré-clínicos com camundongos, com a proteção transferida também para a prole.

Outros pesquisadores como Fenou, Mielcarek e Locht (2016) a partir de estudos também em camundongos puderam observar que a imunização materna protege o neonato contra a coqueluche e que o uso de diferentes vacinas contra o patógeno não influencia na vacinação infantil e estudos de Hwang et al., 2010 contra o vírus influenza H5N1 também se mostraram promissores para a imunização materno-fetal em camundongos.

Apesar da ampla gama de artigos publicados, não há estudos na literatura nos quais OMVs de *Neisseria meningitidis* tenham sido complexadas ao lípide catiônico DODAB-BF para imunização materno-fetal, logo, esse estudo teve como objetivo avaliar o DODAB-BF

como adjuvante e sua capacidade de proporcionar uma resposta humoral protetora na prole de mães que foram imunizadas com este adjuvante junto às OMVs.

Parte deste estudo foi:

- Aceito para publicação na revista Pathogens and Disease: DE ALMEIDA, A.F.; DE GASPARI, E. Dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB-BF) as a new adjuvant for maternal-fetal immunization in mice against *Neisseria meningitidis*: Evaluation of humoral response. Pathogens and disease, 2018. doi: 10.1093/femspd/ftx128.

- Apresentado em 19 de julho de 2017 no 18th International Congress of Mucosal Immunology (19/07/2017- 22/07/2017) – Washington D.C. U.S.A - W01. Analysis of Immunization in Outbred Mice with Diferent Adjuvants: Interference in Production and Maternal-Fetal Transfer of Antibodies.

CONCLUSÃO

- O adjuvante DODAB-BF em associação ao antígeno, foi capaz de gerar anticorpos IgG para *N. meningitidis* B nas fêmeas de camundongos adultos após imunização pelas vias IN/SC ou SC/IM.

- A imunização de fêmeas de camundongos com OMVs junto a DODAB-BF ou HA pela via SC/IM ou OMVs + DODAB-BF pela via IN/SC é capaz de promover a transferência passiva (materno-fetal) de anticorpos quando estes são imunizados, com títulos significativos, até a quinta semana de vida da prole.

- Nas proles de mães imunizadas com OMVs+DODAB-BF ou HA pela via SC/IM, os anticorpos apresentaram baixa avidez, porém é possível que ainda possuam função efetora, uma vez que mesmo apresentando baixa avidez a efetividade da resposta dependerá da carga bacteriana na infecção e da quantidade de anticorpos que está presente para desenvolver a resposta imune.

- Os anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados com OMVs + DODAB-BF e OMVs + HA pela via SC/IM reconheceram antígenos imunogênicos da cepa homóloga pela técnica de *immunoblotting*, sendo que o mesmo ocorreu com a prole. Nas mães, a imunização com OMVs + DODAB-BF é capaz de gerar o reconhecimento específico de um maior número de antígenos que OMVs + HA.

- A reatividade cruzada dos anticorpos IgG em fêmea imunizada com OMVs + DODAB-BF com antígenos de cepas heterólogas de *Neisseria meningitidis* foi superior ao soro do camundongo imunizado com OMVs + HA sugerindo, que o DODAB-BF é superior ao HA para auxiliar na indução da resposta imune cruzada com cepas heterólogas, o que é útil em uma vacina universal, no entanto as proles não apresentaram grande diferença quanto a reatividade cruzada.

- A imunização pela via IN/SC com OMVs + DODAB-BF resulta em anticorpos de baixa avidez no camundongo adulto fêmea e sua prole, não havendo reconhecimento de antígenos da cepa homóloga e baixo reconhecimentos de antígenos da cepa heteróloga pela prole, assim a imunização pela via IN/SC utilizando OMVs+DODAB-BF parece não ser a ideal.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K. et al. Imunologia Celular e Molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABDILLAH, H.; POOLMAN, J. T. *Neisseria meningitidis* Group B Serosubtyping Using Monoclonal Antibodies in Whole-Cell Elisa. **Microbial Pathogenesis**, v.4, n.1, p- 27-32, 1988.

ALAM, M.M; BHUIYAN, T.R.; QADRI, F. Short communication on: study of avidity of antigen-specific antibody as a means of understanding development of long-term immunological memory after *vibrio cholera* O1 infection. **Journal of Vaccines & Vaccination**, v.8, 2017. Acesso em 28 de dezembro de 2017. Disponível em: < https://www.omicsonline.org/open-access/short-communication-on-study-of-avidity-of-antigenspecific-antibody-as-a-means-of-understanding-development-of-longterm-immunologi-2157-7560-1000363.php?aid=91533/ >.

APOSTÓLICO, J.D.S.; LUNARDELLI, V.A.S.; COIRADA, F.C.; BOSCARDIN, S.B.; ROSA, D.S. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, n.1, p. 1-16, 2016.

APPLEBY, P.; CATTY, D. Transmission of immunoglobulin to foetal and neonatal mice. **Journal of Reproductive Immunology**, v.5, n.4, p.203-213, 1983.

AWATE, S.; BABIUK, L.A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. 114, p.1-10, 2013.

BALKOVIC, E.S.; FLORACK, J.A.; SIX, H.R. Immunoglobulin G subclass antibody responses of mice to influenza virus antigens given in different forms. **Antiviral research**, v. 8, n. 3, p. 151-160, 1987.

BECARIA, A; CAMPBELL, A; BONDY, S. C. Aluminum as a toxicant. **Toxicology and industrial health**, v. 18, n. 7, p. 309–320, 2002.

BERNOCCHI, B.; CARPENTIER, R.; BETBEDER, D. Nasal nanovaccines. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 560, n.1, p. 128-138, 2017.

BORROW, R.; ALARCÓN, P.; CARLOS, J.; CAUGANT, D. A.; CHRISTENSEN, H.; DEBBAG, R.; DE WALS, P.; ECHÁNIZ-AVILES, G.; FINDLOW, J.; HEAD, C.; HOLT, D.; KAMIYA, H.; SAHA, S.K.; SIDORENKO, S.; TAHA, M.K.; TROTTER, C.; MORENO, J. A. V.; GOTTBERG, A. V.; SÁFADI, M.A.P. The Global Meningococcal Initiative: Global Epidemiology, the Impact of Vaccines on Meningococcal Disease and the Importance of Herd Protection. **Journal Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 4, p. 313-328, 2017.

BRITO, Luciana Tendolini. **Avaliação de diferentes vias de imunização com novo adjuvante para *Neisseria meningitidis* em diferentes linhagens de camundongos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BOSIS, S.; MAYER, A.; ESPOSITO, S. Meningococcal Disease in Childhood: Epidemiology, Clinical Features and Prevention. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 56, n.3, p. E121–E124, 2015.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and Characterization of Large Dioctadecyldimethylammonium Chloride Liposomes and Comparison with Small Sonicated Vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 733, n. 1, p. 172 – 179, 1983.

CARNEIRO, C.; CORREIA, A.; COLLINS, T.; VILANOVA, M.; PAIS, C.; GOMES, A.C.; OLIVEIRA, E.C.D.R; SAMPAIO, P. DODAB: Monoolein Liposomes Containing *Candida albicans* Cell Wall Surface Proteins: A Novel Adjuvant and Delivery System. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 190-200, 2015.

CAUGANT, D.A.; KRISTIANSEN, P.A.; WANG, X.; MAYER, L.W.; TAHA, M.K.; OUE´DRAOGO, R.; KANDOLO, D.; BOUGOUDOGO, F.; SOW, S.; BONTE, L. Molecular Characterization of

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

Invasive Meningococcal Isolates from Countries in the African Meningitis Belt before Introduction of a Serogroup A Conjugate Vaccine. **Plos One**, v. 7, n. 9, p.1-9, 2012

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). Dados Estatísticos, São Paulo. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia- epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/meningites/dados/ meni_graficos.pdf>. Acesso em: 24 Jan. 2018.

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

CHAMOT-ROOKE, J.; MIKATY, G.; MALOSSE, C.; SOYER, M.; DUMONT, A.; GAULT, J.; IMHAUS, A.; MARTIN, P.; TRELLET, M.; CLARY, G.; CHAFEY, P.; CAMOIN, L.; NILGES, M.; NASSIF, X.; DUMÉNIL, G. Posttranslational Modification of Pili upon Cell Contact Triggers *N. meningitidis* Dissemination. **Science**. v. 331, n. 6018, p. 778-782, 2011.

CHRISTENSEN, D.; KORSHOLM, K.S.; ANDERSEN, P.; AGGER, E.M. Cationic Liposomes as Vaccine Adjuvants. **Expert Reviews**, v. 10, n. 4, p. 513-521, 2011.

CHRISTENSEN, D. Vaccine Adjuvants: Why and How. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 2, n. 10, p. 2709-2711, 2016.

DALSEG, R.; WEDEGE, E.; HOLST, J.; HAUGEN, I. L.; HOIBY, E. A.; HANEBERG, B. Outer membrane vesicles from group B meningococci are strongly immunogenic when given intranasally to mice. **Vaccine**, v. 17, n. 19, p. 2336-2345, 1999.

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

DE GASPARI, E.N. Comparison of dot-ELISA and standard ELISA for detection of *Neisseria meningitidis* outer membrane complex-specific antibodies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.1, p. 35-40, 2010.

ENGLUND, J.A. The Influence of Maternal Immunization on Infant Immune Responses. **Journal of Comparative Pathlogy**, v. 137, n 1, P. S16-S19, 2007.

FEUNOU, P. F.; MIELCAREK, N.; LOCHT, C. Reciprocal interference of maternal and infant immunization in protection against pertussis. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1062-1069, 2016.

FERNANDES, R.M.B.P.; DORO, C.M.; REIS, R.; SILVA, A.P.M.; SOUZA, D.F.; BARBOSA, H.A.; FUKASAWA, L.O.; GONÇALVES, M.G. Doença Meningocócica: Investigação de Surto Comunitário no Distrito Administrativo do Ipiranga, Município de São Paulo, julho de 2007. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, São Paulo, v. 4, n. 44, p.10-17, 2007. Disponível em: < http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806- 42722007000800002&lng=pt&tlng=pt.> Acesso em: 15 de Mar de 2017.

FRASCH, C.E.; ZOLLINGER, W.D.; POOLMAN, J.T. Serotype Antigens of *Neisseria meningitidis* and a Proposed Scheme for Designation of Serotypes. **Review of Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 1985.

GALL, D. The Adjuvant Activity of Aliphatic Nitrogenous Bases. **Immunology**, v. 11, n. 4, p. 369–386, 1966.

GASPAR, E.B.; ROSETTI, A.S.; LINCOPAN, N.; DE GASPARI, E.N. *Neisseria lactamica* Antigens Complexed with a Novel Cationic Adjuvant. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 572-581, 2013.

GASPARINI, R.; PANATTO, D.; BRAGAZZI, N.L.; LAI, P.L.; BECHINI, A.; LEVI, M.; DURANDO, P.; AMICIZIA, D. 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, 2015. Acesso em 19 de abril de 2017. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553322/ >.

GERDTS, V.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; POTTER, A. Protection of neonates and infants by maternal immunization. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 11, p. 1347-1349, 2016.

GHIMIRE, T.R. The Mechanisms of Action of Vaccines Containing Aluminum Adjuvants: An *In Vitro* vs *In Vivo* Paradigm. **SpringerPlus**, v. 4, n. 181, p. 1-18, 2015.

GRANOFF, D. M.; MASLANKA, S. E.; CARLONE, G. M.; PLIKAYTIS, B. D.; SANTOS, G. F.; MOKATRIN, A.; RAFF, H. V. 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.

HANEBERG, B.; DALSEG, R.; WEDEGE, E.; HØIBY, E. A.; HAUGEN, I. L.; OFTUNG, F.; ANDERSEN, S.R.; NAESS, L.M.; AASE, A.; MICHAELSEN, T.E.; HOLST, J. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. **Infection and immunity**, v. 66, n. 4, p. 1334-1341, 1998.

HARRIS, S.L; DONALD, R.G.K.; HAWKINS, J.C.B.S; TAN, C.B.S.; O'NEILL, R.; MCNEIL, L.K.; PEREZ, J.L.M.D.; ANDERSON, A.S.; JANSEN, K.U.; JONES, T.R. *Neisseria meningitidis* Serogroup B Vaccine, Bivalent rLP2086, Induces Broad Serum Bactericidal Activity Against Diverse Invasive Disease Strains Including Outbreak Strains. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n.2, p. 216-233, 2017.

HARRIS, S.L.; TSAO, H.; ASHTON, L.; GOLDBLATT, D.; FERNSTEN, P. Avidity of the immunoglobulin G response to a *Neisseria meningitidis* group C polysaccharide conjugate vaccine as measured by inhibition and chaotropic enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14 , n. 4, p. 397-403, 2007.

HARRISON, O. B.; CLAUS, H.; JIANG, Y.; BENNETT, J. S.; BRATCHER, H. B.; JOLLEY, K. A.; CORTON, C.; CARE, R.; POOLMAN, J. T.; ZOLLINGER, W. D.; FRASCH, C. E.; STEPHENS, D. S.; FEAVERS, I.; FROSCH, M.; PARKHILL, J.; VOGEL, U. QUAIL, M. A.; BENTLEY, S. D.; MAIDEN, M. C. J. Description and Nomenclature of *Neisseria meningitidis* Capsule Locus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 566–573, 2013.

HARYONO, A.; SALSABILA, K.; RESTU, W. K.; HARMAMI, S.B.; SAFARI D. Effect of Chitosan and Liposome Nanoparticles as Adjuvant Codelivery on the Immunoglobulin G Subclass Distribution in a Mouse Model. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017. Acesso em 14 de dezembro de 2017. Disponível em: < http://doi.org/10.1155/2017/9125048 >.

HENRIKSEN-LACEY, M.; CHRISTENSEN, D.; BRAMWELL, V. W.; LINDENSTROM, T.; AGGER, E. M.; ANDERSEN, P.; PERRIE, Y. Comparison of the depot effect and immunogenicity of liposomes based on dimethyldioctadecylammonium (DDA), 3β-[N-(N',N'-Dimethylaminoethane)carbomyl] cholesterol (DC-Chol), and 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP): prolonged liposome retention mediates stronger Th1 responses. **Molecular Pharmaceutics**. v. 8, n. 1, p. 153- 161, 2011.

HILGERS L.A; SNIPPE, H. DDA as an Immunological Adjuvant. **Research in immunology**, v. 143, n. 5, p. 494-503, 1992.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, p. S45-S53, 2005.

HOLST, J.; OSTER, P.; ARNOLD, R.; TATLEY, M.V.; NÆSS, L. M.; AABERGE, I.S.; GALLOWAY, Y.; MCNICHOLAS, A.; O'HALLAHAN, J.; ROSENQVIST, E.; BLACK, S. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 9, n. 6, p. 1241-1253, 2013.

HOTOMI, M.; KONO, M.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E.; YAMANAKA, N. Protection of pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with Pneumococcal Surface Protein A. **Advances in Oto-Rhino-Laryngology**, v.72, pp 121–125, 2011.

HWANG, S.D.; SHIN, J.S.S.; KU, K.B.; KIM, H.S.; CHO, S.W.; SEO, S.H. Protection of pregnant mice, fetuses and neonates from lethality of H5N1 influenza viruses by maternal vaccination. **Vaccine**, v. 28, n. 17, p. 2957-2964, 2010.

ISRAELI, E.; AGMON-LEVIN, N.; BLANK, M.;SHOENFELD, Y.. Adjuvants and autoimmunity. **Lupus**, v. 18, n. 13, p. 1217–1225, 2009.

JACKSON, L.A.; WENGER, J.D. Laboratory-based surveillance for meningococcal disease in selected areas, United States, 1989-1991. **MMWR CDC Surveill Summ**, v. 42, n. 2, p. 21-30, 1993.

JAMESON, S.C.; MASOPUST, D. What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? Reevaluating the Potential of Mouse Models for the Human Immune System. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2017, 2017. Acesso em 25 de Outubro de 2017. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/early/2017/03/27/cshperspect.a029132.long>.

KACHIKIS, A.; ENGLUND, J.A. Maternal immunization: Optimizing protection for the mother and infant. **Journal of Infection**, v. 72, n.5, p. S83-S90, 2016.

KLEIN, S.L; MARRIOTT, I; FISH, E.N. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 1, p. 9-15, 2015.

KUMAR, P.; CHEN, K.; KOLLS, J.K. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. **Current opinion in immunology**, v. 25, n. 3, p. 373-380, 2013.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LEMOS, Ana Paula Silva de. **Caracterização Fenotípica e Genotípica de Cepas de *Neisseria meningitidis* Sorogrupo B: Sorotipo 4 Isoladas no Brasil**. 118 f. 2005. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2005.

LEVY, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 379-390, 2007.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. *In Vivo* Activity of a Novel Amphotericin B Formulation with Synthetic Cationic Bilayer Fragments**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 412-418, 2003.

LINCOPAN, N.; ESPÍNDOLA, N.M.; VAZ, A.J.; DA COSTA, M.H.B.; FAQUIM-MAURO, E.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Novel Immunoadjuvants Based on Cationic Lipid: Preparation, Characterization and Activity *In Vivo*. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5760-5771, 2009.

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

LUIZ, W.B.; RODRIGUES, J.F.; CRABB, J.H.; SAVARINO, S.J.; FERREIRA, L.C.S. Maternal vaccination with a fimbrial tip adhesin and passive protection of neonatal mice against lethal human enterotoxigenic *Escherichia coli* Challenge. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 12, p.4555-4564, 2015.

MARRACK, P.; MCKEE, A.S.; MUNKS, M.W. Towards an Understanding of the Adjuvant Action of Aluminium. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 287-293, 2009.

MATSUNAMI, T.; KOLMER, J.A. The relation of the meningococcidal activity of the blood to resistance to virulent meningococci. **The Journal of. Immunology**, v. 3, n. 3, p. 201–212, 1918.

MAYER, L. Mucosal immunity. **Pediatrics**, v. 111, n. 3, p. 1595-1600, 2003.

MARUGGI, G.; CHIAROT, E.; GIOVANI, C.; BUCCATO, S.; BONACCI, S.; FRIGIMELICA, E.; MARGARIT, I.; GEALL, A.; BENSI, G.; MAIONE, D. Immunogenicity and protective efficacy induced by self-amplifying mRNA vaccines encoding bacterial antigens. **Vaccine**, v. 35, n. 2, p. 361-368, 2017.

MCCORMICK, J.B.; GUSMÃO, H.H.; NAKAMURA, S.; FREIRE, J.B.; VERAS, J.; GORMAN, G.; FEELEY, J.C.; WINGO, P. Antibody response to serogroup A and C meningococcal polysaccharide vaccines in infants born of mothers vaccinated during pregnancy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 5, p. 1141-1144, 1980.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portal da Saúde, Perguntas e Respostas, 2014. Disponível em: < http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/659-secretaria-svs/vigilancia-de-a-az/meningites/11339-perguntas-e-respostas> Acesso em 13 de Mar. de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portal da Saúde, 2017. Disponível em: < http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao> Acesso em 13 de Mar. de 2017.

MORAES, J.C.; BARATA, R.B. A Doença Meningocócica em São Paulo, Brasil, no Século XX: Características Epidemiológicas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1458-1471, 2005.

MORO, P.L.; BRODER, K.; ZHETEYEVA, Y.; WALTON, K.; ROHAN, P.; SUTHERLAND, A.; GUH, A.; HABER, P.; DE STEFANO, F.; VELLOZZI, C. Adverse events in pregnant women following administration of trivalent inactivated influenza vaccine and live attenuated influenza vaccine in the Vaccine Adverse Event Reporting System, 1990-2009. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n.2, p. 146.e1-146.e7, 2011.

MUNIZ, Bruno Pacola. **Efeito da imunização materna com ovalbumina na ativação de células dendríticas e geração de linfócitos T reguladores na prole de camundongos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

NADEL, S. Treatment of Meningococcal Disease. **Journal of Adolescent Health**, v. 59, n. 2, p. S21-S28, 2016.

NAGAPUTRA, J.C.; ROLLIER, C.S.; SADARANGANI, M.; HOE, J.C.; MEHTA, O.H.; NORHEIM, G; SALEEMB, M.; CHANC, H.; DERRICKB, J.P.; FEAVERSC, I.; POLLARD, A.J.; MOXON, E.R. *Neisseria meningitidis* native outer membrane vesicles containing different lipopolysaccharide glycoforms as adjuvants for meningococcal and nonmeningococcal antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 2, p. 234-242, 2014.

NAKAHASHI-OUCHIDA, R.; YUKI, Y.; KIYONO, H. Development of a nanogel-based nasal vaccine as a novel antigen delivery system. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 12, p.1231-1240, 2017.

NEURATH, M.F.; FINOTTO, S.; GLIMCHER, L.H. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. **Nature medicine**, v. 8, n. 6, p. 567-573, 2002.

NEVES, S. M. P.; PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A.; FONTES, R. S.; SANTANA, R. O. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, 2013. Disponível em: < http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>. Acesso em 14 de maio de 2017.

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

O'DEMPSEY, T.J.; MCARDLE, T.; CEESAY, S.J.; SECKA, O.; DEMBA, E.; BANYA, W.A.; Francis, N.; GREENWOOD, B.M. Meningococcal antibody titres in infants of women immunised with meningococcal polysaccharide vaccine during pregnancy. **Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition**, v. 74, n. 1, p. F43-F46, 1996.

OMER, S.B. Maternal Immunization. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 13, p. 1256-1267, 2017.

OVIEDO-ORTA, E.; AHMED, S.; RAPPUOLI, R.; BLACK, S. Prevention and Control of Meningococcal Outbreaks: The Emerging Role of Serogroup B Meningococcal Vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 31, p. 3628-3635, 2015.

PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A.L.; ZAGO, C.A.; CARNEIRO-SAMPAIO1, M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012. Acesso em 14 de dezembro de 2017. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2012/985646>.

PAPPAS, M.G. Dot immunobinding assay (Dot-ELISA) for a rapid clinical serodiagnosis of protozoan and metazoan diseases. **Handbook of Immunoblotting of Proteins**. Experimental and clinical application v. 2 p. 145-155, 1988a.

PAPPAS, M.G. Recent applications of the DOT-ELISA in immunoparasitology. **Veterinary Parasitology**, v.29, n. 2, p.105-129, 1988b.

PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. *Neisseria meningitidis:* pathogenesis and immunity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 68-72, 2015.

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

POLTAVCHENKO, A.G.; NECHITAYLO, O.V.; FILATOV, P.V.; ERSH, A.V.; GUREYEV, V.N. Multiplex method for initial complex testing of antibodies to blood transmitted diseases agents. **Journal of virological methods**, v. 236, p. 231-236, 2016.

QUAGLIARELLO, V. Dissemination of *Neisseria meningitidis*. **The New England Journal of Medicine**. v. 364, n. 16, p. 1573-1575, 2011.

REED, S.G.; BERTHOLET, S.; COLER, R.N.; FRIEDE, M. New Horizons in Adjuvants for Vaccine Development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2009.

REQUEJO, H. I. Z. A Meningite Meningocócica no Mundo: Dois séculos de História das Epidemias. In: História da doença meningocócica. 1 ed. São Paulo: El – Edições Inteligentes, 2005. p.10 – 13.

RINALDI, Fabiana Mahilowski. **Imunogenicidade de antígenos de vesículas de membrana externa (OMVs) de *Neisseria meningitidis* B associado ao lípide catiônico (DDA- BF)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Fc receptors: cell activators of antibody functions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n.4, p.21-33, 2013.

RUGGIERI, A.; ANTICOLI, S.; D'AMBROSIO; GIORDANI, L.; VIORA, M. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 52, n.2, p. 198-204, 2016.

SÁFADI, M. A. P.; BEREZIN, E.N.; OSELKA, G. W. A Critical Appraisal of the Recommendations for the Use of Meningococcal Conjugate Vaccines. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n.3, p.195-202, 2012.

SADARANGANI, M. POLLARD, A.J. Serogroup B Meningococcal Vaccines—An Unfinished Story. The Lancet Infectious Diseases. v. 10, n. 2, p. 112-124, 2010.

SANTOS, Fernanda Ayane de Oliveira. **Avaliação da diferença da resposta imune em camundongos neonatos utilizando antígenos de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B complexados com dois diferentes adjuvantes**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SAVONA-VENTURA, C. An Outbreak of Cerebrospinal Fever in a 19th Century British Mediterranean Naval Base. **Journal of the Royal Army Medical Corps**. v. 140, n. 3, p. 155-158, 1994.

SHAHID, N.S.; STEINHOFF, M.C.; ROY, E.; BEGUM, T.; THOMPSON, C.M.; SIBER, G.R. Placental and breast transfer of antibodies after maternal immunization with polysaccharide meningococcal vaccine: a randomized, controlled evaluation. **Vaccine**, v. 20, n. 17, p. 2404-2409, 2002.

SHOENFELD, Y; AGMON-LEVIN, N. 'ASIA'–autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. Journal of autoimmunity, v. 36, n. 1, p. 4-8, 2011.

STEPHENS, D.S.; GREENWOOD, B.; BRANDTZAEG, P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis.* **The Lancet**, v.369, n. 9580, p. 2196-2210, 2007.

STEPHENS, D.S. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium Neisseria meningitidis. **Vaccine**, v.27, p. 71-77, 2009.

SWAMY, G.K.; BEIGI, R.H. Maternal Benefits of Immunization During Pregnancy. **Vaccine**, v. 33, n. 47, p. 6436-6440, 2015.

TADA, R.; HIDAKA, A.; IWASE, N.; TAKAHASHI, S.; YAMAKITA, Y.; IWATA, T.; MUTO, S.; SATO, E.; TAKAYAMA, N.; HONJO, E.; KIYONO, H.; KUNISAWA, J.; ARAMAKI, Y. Intranasal immunization with DOTAP cationic liposomes combined with DC-cholesterol induces potent antigen-specific mucosal and systemic immune responses in mice. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1-21, 2015.

TAPIA, M.D.; SOW, S.O.; TAMBOURA, B.; TÉGUETÉ, I.; PASETTI, M.F.; KODIO, M.; ONWUCHEKWA, U.; TENNANT, S.M.; BLACKWELDER, W.C.; COULIBALY, F.; TRAORÉ, A.; KEITA, A.M.; HAIDARA, F.C.; DIALLO, F.; DOUMBIA, M.; SANOGO, D.; DEMATT, E.; SCHLUTERMAN, N.H.; BUCHWALD, A.; KOTLOFF, K.L.; CHEN, W.H.; ORENSTEIN, E.W.; ORENSTEIN, L.A.V.; VILLANUEVA, J.; BRESEE, J.; TREANOR, J.; LEVINE, M.M. Maternal Immunisation with Trivalent Inactivated Influenza Vaccine for Prevention of Influenza in Infants in Mali: A Prospective, Active-Controlled, Observer-Blind, Randomised Phase 4 Trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1026-1035, 2016.

VERMONT, C.L.; VAN DIJKEN, H.H.; VAN LIMPT, C.J.P.; DE GROOT, R.; VAN ALPHEN, L.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G.P.J.M. 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.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. 520, p. 1-17, 2014.

WEDEGE, E.; FROHOLM, L.O. Human antibody response to a group B serotype 2a meningococcal vaccine determined by immunoblotting. **Infection and immunity**, v. 51, n. 2, p. 571-578, 1986.

WEDEGE, E.; HOIBY, E.A.; ROSENQVIST, E.; FROHOLM, L.O. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by coagglutination, dot-blotting and ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n.3, p. 195-201, 1990.

WESTERINK, M.A.J.; SMITHSON, S.L.; SRIVASTAVA, N.; BLONDER, J.; COESHOTT, C.; ROSENTHAL, G.J. ProJuvant™ (Pluronic F127®/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 20, n.5, p. 711-723, 2001.

YAMAUCHI, K.; HOTOMI, M.; BILLAL, D.S.; SUZUMOTO, M.; YAMANAKA, N. Maternal intranasal immunization with outer membrana protein P6 maintains specific antibody level of derived offspring. **Vaccine**, v. 24p. 5294-5299, 2006.