

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**FORMULAÇÃO INTRANASAL PARA VACINA MENINGOCÓCICA C
CONJUGADA**

ISABELLY SANTOS PEREIRA

**Rio de Janeiro
2017**



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ISABELLY SANTOS PEREIRA

Formulação Intranasal para Vacina Meningocócica C Conjugada

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/ Fiocruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

RIO DE JANEIRO

2017

Ficha catalográfica elaborada pela
SIGDA - Seção de Gestão de Documentos e Arquivos
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

P434

Pereira, Isabelly Santos.

Formulação intranasal para vacina meningocócica C conjugada. /
Isabelly Santos Pereira. – Rio de Janeiro, 2017.

xvi, 58 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos,
Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2017.

Bibliografia: f. 51-58

1. Vacina meningocócica C conjugada. 2. Intranasal. 3. Quintosana.
4. Mucosa. I. Título.

CDD 616.8201

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Bacteriana, do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Elezer Monte Blanco Lemes.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ISABELLY SANTOS PEREIRA

FORMULAÇÃO INTRANASAL PARA
VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elezer Monte Bianco Lemes

Dissertação aprovada em 22 de junho de 2017.

Examinadores:


Dra. Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira
Fiocruz/Presidente


Dra. Luciana da Silva Madeira
Fiocruz


Dra. Priscilla Finotelli
UFRJ

RIO DE JANEIRO
2017

Dedico este trabalho aos meus pais e
ao meu esposo com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas oportunidades as quais me confiou para progresso.

À Fundação Oswaldo Cruz, em especial ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), pela oportunidade profissional e de desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Elezer Monte Blanco pela orientação, apoio e ensinamento.

À Ana Maria Pereira pela orientação desmedida, amizade, estímulo e dedicação em todos os momentos da minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao Dr. Jose Procópio Moreno Senna pelo apoio e auxílio com seus conhecimentos para o experimento animal.

À Dra. Ivna Alana Silveira pela disponibilidade, apoio e auxílio com todo seu conhecimento nos testes de experimento animal.

Ao Dr. Marco Antonio Stephano pelo auxílio esclarecendo dúvidas, respondendo sempre os e-mails de forma solícita.

À Dra. Tânia Pinheiro Pato que me auxiliou com seu conhecimento.

À Dra. Mariana Miguez Tardelli pelo auxílio durante toda a execução do trabalho.

Ao Dr. Milton Neto da Silva pela realização do teste de Ressonância Magnética Nuclear.

À Dra. Ana Paula dos Santos pelos ensinamentos no teste de Elisa e disponibilidade para esclarecimento de dúvidas.

À Denise Aparecida Ramos e à Dra. Ana Paula Argondizzo pelo apoio no teste de *Dot blot*.

À Amanda Maria Nunes pelo auxílio na execução do teste de *Dot blot* e constante ajuda em todos os momentos.

À equipe do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) que possibilitou a execução de toda parte experimental deste trabalho.

Ao Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB) por serem sempre solícitos na realização de testes, no fornecimento de amostras e no esclarecimento de dúvidas.

À equipe do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) que possibilitou a execução do experimento animal deste trabalho.

Ao Departamento de Vacinas Bacterianas (DEBAC) por todo aprendizado e apoio para análise de liberação do antígeno, principalmente à Seção de Conjugação de Polissacarídeos (SECOP).

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) pela ajuda na realização dos testes de caracterização das partículas, principalmente à Dra. Priscilla Finotelli e à Mariana Longuinho.

À Dra. Suzana Frasés pelo auxílio na execução do teste de potencial zeta.

À Priscila Muniz que esteve sempre disponível para o uso do leitor de placas.

Aos colegas de equipe do Projeto Interferon pelo apoio e compreensão.

Aos colegas do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos pelo convívio, experiência e apoio.

Aos professores do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos que com seus conhecimentos contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À coordenação e a secretaria do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos.

Aos meus amigos que me apoiaram em diversos momentos, em particular à Aline Rodrigues Venâncio, Luana de Souza Vianna, Camila Eleotério Lopes, Thaís Alves da Silva, Bruno Galvão de Oliveira, Filipe de Paula Silva, Thiago da Conceição Martins, Rodrigo de Souza Paiva e Patrícia da Silva Freitas.

À minha família que me apoiou durante todo esse momento, convivendo de forma carinhosa com minha oscilação de humor e ausência em diversos momentos.

A todos que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

“Nascer, morrer, renascer, ainda, e
progredir sempre, tal é a lei.”
(Alan Kardec)

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Vacinas: um breve histórico	3
1.2 <i>Neisseria meningitidis</i> : patogênese e epidemiologia.....	5
1.2.1 Epidemiologia e o impacto das vacinas contra <i>Neisseria meningitidis</i>	7
1.3 Vacinas contra <i>Neisseria meningitidis</i> do sorogrupo C	9
1.3.1 Vacinas Polissacarídicas x Vacinas Conjugadas	11
1.3.2 Vacina Meningocócica C Brasileira	12
1.4 Sistema Imunológico de Mucosa	13
1.4.1 Abordagens para vacinação de mucosa	14
1.4.2 Quitosana	17
1.5 Justificativa	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Equipamentos	22
3.2 Materiais	23
3.3 Reagentes.....	23
3.4 Antígeno.....	23
3.5 Metodologia	24
3.5.1 Preparação das partículas de quitosana	24
3.5.2 Quantificação de Proteínas	25
3.5.3 Avaliação da Eficiência de Encapsulamento	26
3.5.4 Caracterização das partículas	26
3.5.4.1 Tamanho de Partículas.....	26
3.5.4.2 Potencial zeta.....	27

	ix
3.5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
3.5.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	27
3.5.6 Reação de <i>Dot blot</i>	28
3.5.7 Imunização	29
3.5.8 Ensaio desafio	30
3.5.9 Coleta das amostras.....	30
3.5.9.1 Soro.....	31
3.5.9.2 Saliva.....	31
3.5.10 Determinação de título de anticorpos (ELISA- <i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>).....	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulamento (EE%)	34
4.2 Caracterização das partículas.....	35
4.2.1 Tamanho de partículas.....	35
4.2.2 Potencial zeta	37
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
4.3 Ressonância Magnética Nuclear	38
4.4 Reação de <i>Dot blot</i>	40
4.5 Ensaio desafio	41
4.6 Teste de ELISA para quantificação de anticorpos	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
BALT	<i>Bronchus-associated lymphoid tissues</i> (Tecido Linfóide Associado aos Brônquios)
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> (Ácido Bicinconinico)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica)
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CD	Células Dendriticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro (unidade de medida)
°C	Graus Celsius (unidade de temperatura)
D	Símbolo informal do elemento químico Deutério
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de Encapsulamento
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Símbolo do elemento químico Hidrogênio
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B
Hz	<i>Hertz</i>
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
K	Kelvin (unidade de temperatura)
Kg	Kilograma
LABIOMAT	Laboratório de Biomateriais
LAEAN	Laboratório de Experimentação Animal
LATEB	Laboratório de Tecnologia Bacteriana
LP	Lâmina Própria
M	Molar (unidade de massa)

MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissues</i> (Tecido Linfoide Associado a Mucosa)
mAU	Mili unidade de absorvância
Men C	Meningococo sorogrupo C
MHz	MegaHertz
mg	Miligrama (unidade de massa)
mL	Mililitro (unidade de volume)
mM	Milimolar (unidade de massa)
mV	Milivolt
NALT	<i>Nasopharynx-associated lymphoid tissue</i> (Tecido Linfoide Associado à Nasofaringe)
NANA	ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
ng	Nanograma (unidade de massa)
nm	Nanometro (unidade de medida)
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i> (Proteína de membrana externa)
OVA	Ovalbumina
PBAE	Poli- β - amino ester
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo)
ppm	Parte por milhão
p/v	Peso por volume
Rcf	Força Centrífuga Relativa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopeia dos Estados Unidos)
v/v	Volume por volume
VLP	<i>Virus-Like Particle</i> (Partícula pseudo-viral)
μ g	Micrograma (unidade de massa)
μ L	Microlitro (unidade de volume)
μ m	Micrometro (unidade de medida)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Estrutura da cápsula polissacarídica dos seis principais sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> (Adaptado de Willis & Whitfield 2013).	6
Tabela 1.2: Principais vacinas Conjugadas e Polissacarídicas disponíveis comercialmente contra <i>N. meningitidis</i> do sorogrupo C (Adaptada de Borrow et al. 2013).	10
Tabela 1.3: Avaliação da resposta imunológica de vacinas polissacarídicas e de vacinas conjugadas (Adaptado de Ali et al. 2014).....	11
Tabela 1.4: Vacinas de mucosa licenciadas (Adaptado de Lycke 2012).....	15
Tabela 1.5: Principais sistemas de liberação de partículas (Adaptado de Faraji & Wipf 2009; Gill 2013; Kim et al. 2014; Zhao et al. 2014).	17
Tabela 1.6: Avaliação <i>in vivo</i> de algumas nanovacinas baseadas em quitosana. (Adaptado de Cordeiro et al. 2015).	19
Tabela 3.1: Esquema de Imunização e coleta.....	31
Tabela 4.1: Taxas de eficiência de encapsulamento (EE%) utilizando as concentrações de quitosana 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v) na formulação. Ensaio realizado em duplicata.	34
Tabela 4.2: Tamanho médio das partículas nas formulações da vacina meningocócica C conjugada em diferentes concentrações de quitosana. Leitura realizada em um único ensaio e os dados de desvio padrão foram fornecidos pelo equipamento.	35
Tabela 4.3: Medidas de potencial zeta das formulações com quitosana 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v). Média de dez leituras para cada amostra.	37
Tabela 4.4: Avaliação da proteção de camundongos desafiados com suspensão bacteriana após 21 dias de imunização com 2 doses intranasal e 1 dose intramuscular, em intervalos de 15 dias. Avaliação durante 72 h após inoculação de Ferro- Dextran e desafio com <i>N. meningitidis</i> sorogrupo C.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Desenvolvimento da produção de vacinas (Adaptada de Josefsberg & Buckland 2012).	4
Figura 1.2: Imagem da bactéria <i>N. meningitidis</i> . http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolscolleges/topics/microbial-genetics-1/human-pathogens-1/neisseria-meningitidis acessado em 27/06/2017).....	5
Figura 1.3: Distribuição dos sorogrupos de <i>N. meningitidis</i> por região no Brasil- Dados de 2015 (DATASUS 2016).	8
Figura 1.4: Esquema da reação de conjugação utilizando a metodologia de aminação reductiva modificada (Souza 2011).....	13
Figura 1.5: Esquema exemplificando a resposta imunológica de mucosa a um antígeno (Lamichhane et al. 2014).....	14
Figura 1.6: Representação da interação das micropartículas com o antígeno (Adaptado de Zhao et al. 2014).....	16
Figura 1.7: Estrutura química da quitosana (Assis & Silva 2003).....	18
Figura 3.1: Esquema de preparo das partículas formadas pelo encapsulamento do insumo farmacêutico ativo da vacina meningocócica C conjugada com o polímero quitosana.....	25
Figura 4.1: Variação da taxa de eficiência de encapsulamento em diferentes concentrações de quitosana na formulação.	35
Figura 4.2: Distribuição do tamanho médio das partículas nas formulações com as concentrações de quitosana: 0,25 %, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v), obtidas a partir do analisador de partículas por difração a laser- SHIMADZU.....	36
Figura 4.3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das suspensões contendo as partículas do antígeno com quitosana.....	37
Figura 4.4: Espectros obtidos na análise de RMN das amostras do IFA da vacina meningocócica C conjugada (A), da solução de quitosana 1,0% (B), do antígeno encapsulado com quitosana (C) e do espectro de DOSY do antígeno encapsulado (D).	39
Figura 4.5: Avaliação da preservação da antigenicidade e identidade a partir da técnica de <i>Dot blot</i> , utilizando como revelador fosfatase alcalina. A) Foram aplicadas as amostras do IFA formulado em quitosana 1,0%, do branco, contendo a formulação sem o antígeno, e do IFA sem a presença de quitosana (controle positivo), nas concentrações de 800, 400, 200 e 100 ng/mL em membranas de nitrocelulose. Para	

todas as amostras foram utilizados anticorpos primários (soro de camundongos imunizados) nas diluições de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. B) Controle negativo nas mesmas concentrações das amostras. O soro de camundongo não imunizado, denominado pré-imune, foi utilizado nas mesmas diluições do anticorpo de camundongos imunizados.....40

Figura 4.6: IgG total presente no soro de camundongos imunizados com 2 doses via intranasal e 1 dose intramuscular, em intervalo de 15 dias. Grupo 1: IFA da vacina meningocócica C conjugada formulada em quitosana; Grupo 2: IFA da vacina meningocócica conjugada; Grupo 3: Formulação em branco; Os valores correspondem à média geométrica de 2 leituras.....42

RESUMO

Neisseria meningitidis do sorogrupo C é a principal bactéria responsável pelos surtos de meningites no Brasil, sendo de grande preocupação pública devido às altas taxas de mortalidade e elevados índices de sequelas deixadas nos sobreviventes. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Unidade da Fundação Oswaldo Cruz desenvolveu uma vacina conjugada contra *N. meningitidis*, a partir da conjugação do polissacarídeo com o toxóide tetânico pelo método de aminação redutiva modificada. Esta vacina encontra-se em estudos clínicos de fase II/III e é administrada de forma injetável. Entretanto, a imunização de mucosa (intranasal) pode ser sugerida devido à característica deste microrganismo em causar infecções a partir das vias aéreas. As vacinas de mucosa oferecem uma melhor resposta imunológica, pois estimulam tanto a resposta imunológica sistêmica quanto à local. Apesar de sua eficiência, poucas são as vacinas que fazem uso dessa forma de administração, devido as dificuldades no desenvolvimento de formulações adequadas. Uma das estratégias adotadas para a entrega do antígeno à mucosa é a utilização de polímeros biodegradáveis, sendo quitosana o mais difundido, por sua capacidade de formação de partículas com o antígeno (encapsulamento), biocompatibilidade, não-toxicidade e mucoadesividade. Este trabalho apresenta uma proposta de formulação intranasal para vacina meningocócica C conjugada utilizando a quitosana para o encapsulamento. Para esta preparação foi utilizado o processo de coacervação a partir do sal de citrato de sódio. Diferentes concentrações de quitosana foram utilizadas para avaliação da proposta mais adequada. Foram testadas as concentrações de quitosana de 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v), para quais se obteve as taxas de encapsulamento de $63,22\% \pm 1,74$, $71,88\% \pm 0,98$, $74,67\% \pm 0,66$ e $82,04\% \pm 0,23$, respectivamente. Além disso, o resultado de caracterização demonstrou tamanhos de partículas inferiores a $1\mu\text{m}$, que conforme estudos prévios estão dentro da faixa de captura das células apresentadoras de antígenos. O tamanho médio obtido foi de 475 nm, 694 nm, 767nm e 734 nm para cada uma das concentrações de quitosana testadas. Os valores de potencial zeta entre +24 e +40mV demonstraram boa estabilidade eletrostática da suspensão. As formulações com solução de quitosana 0,25% (p/v) demonstraram menor tamanho e maior estabilidade das partículas, contudo observou-se menor eficiência de encapsulamento em relação as formuladas com quitosana 1,0%(p/v). Devido a interferência da quitosana na metodologia, não foi possível verificar a preservação da identidade do antígeno após formulação utilizando as técnicas de Ressonância magnética nuclear e *Dot blot*. No desafio animal, todos os camundongos imunizados com o antígeno encapsulado em quitosana tiveram 100% de proteção, assim como os imunizados somente com o antígeno não encapsulado em estudo. Contudo, somente os animais imunizados com o antígeno encapsulado apresentaram títulos de anticorpos IgG no soro. Embora haja necessidade de uma detalhada avaliação imunológica, a metodologia de formulação proposta pode ser promissora para imunização de mucosa contra *N. meningitidis*. Cabe ressaltar ainda que este estudo também pode servir como base para formulações de vacinas contra outros antígenos.

ABSTRACT

Neisseria meningitidis serogroup C is the main bacterium responsible of meningitis outbreaks in Brazil. This is a public great concern due to the high mortality rates and sequelae in survivors. The Immunobiological Technology Institute (Bio – Manguinhos) an Oswaldo Cruz Foundation`s Unit, developed a conjugate vaccine for *N. meningitidis* by conjugation of the polysaccharide with the tetanus toxoid using reductive amination method. This vaccine is in phase II/III clinical trials and the common application of this vaccine is by injection. However, the mucosal immunization (intranasal) can be suggested in this case due to the microorganism feature to cause infection through the respiratory tract. Mucosal vaccines offer a better immune response, because they can stimulate systemic and local responses. However, although the high mucosal immune system efficiency, only a reduced number of vaccines use this administration route, due to difficulties in developing appropriate formulations. An adopted strategy to deliver the antigen to the mucosa is using biodegradable polymers, being chitosan is the most used, due to its ability to form particles with the antigen (encapsulation), biocompatibility, non-toxicity and mucoadhesiveness. This study describes an intranasal formulation strategy for a meningococcal serogroup C conjugate vaccine using the chitosan for encapsulation. For this preparation the coacervation process used sodium citrate salt. Different concentrations of chitosan were also used to evaluate the most appropriate proposal. Chitosan concentrations of 0,25%, 0,5%, 0,75 and 1,0% (w/v) were tested, where were obtained encapsulation rates of $63,22\% \pm 1,74$, $71,88\% \pm 0,98$, $74,67\% \pm 0,66$ e $82,04\% \pm 0,23$, respectively. In addition, the characterization result showed particle sizes below $1\ \mu\text{m}$, which according to previous studies, are within the capture range of the antigen presenting cells. The average size obtained were of 475 nm, 694 nm, 767 nm and 734 nm for each concentration tested. Zeta potential values between +24 and +40 mV demonstrated good electrostatic suspension stability. Formulations with chitosan concentration 0,25%(w/v) showed smaller size and higher stability of the particles. However, this condition showed lower encapsulation efficiency compared with the formulation using chitosan concentration 1,0% (w/v). Due to the interference of the chitosan in the methodology, it was not possible verify the preservation of the antigen identity after formulation using Nuclear Magnetic Resonance and Dot blot techniques. In the animal challenge, all mice immunized with antigen encapsulated with chitosan had 100% protection, as well as those immunized with the non-encapsulated antigen. However, only animals immunized with the encapsulated antigen had IgG antibody titres. Although there is a need for detailed immunological evaluation, the proposed formulation methodology may be promising for mucosal immunization against *N. meningitidis*. It should be emphasized that this study can also be applied as a basis for formulations of vaccines against other antigens.

1 INTRODUÇÃO

A vacinação vem exercendo um papel fundamental no controle, na prevenção e na erradicação de doenças infecciosas. Nas últimas décadas, muitos avanços foram observados no campo produtivo, mas ainda há muitos obstáculos a serem enfrentados. O desenvolvimento de vacinas para novos patógenos não é o único desafio, mas também a produção de vacinas com doses únicas e de vacinas livres de agulhas (Cordeiro et al. 2015).

O sucesso de uma vacina depende de vários fatores e, além do antígeno outras características devem ser observadas, como a via de administração, o número de doses e a formulação adequada, além de se determinar as condições de estocagem e prazo de validade, evitando ao máximo a degradação do material e estendendo seu período de utilização. Neste contexto, deve-se englobar a administração da vacina aos sítios adequados do organismo do indivíduo e a ativação de células imunológicas específicas. A via de administração pode ser por injeção intramuscular ou subcutânea, por liberação transcutânea, oral, nasal ou sublingual. Para cada via de imunização é requerida uma formulação e um método de liberação adequado, também conhecido como *delivery system* (Amorij et al. 2012; Renukaradhya et al. 2015).

A via de imunização mais antiga foi a respiratória praticada na China, através da administração intranasal de materiais contendo o vírus da varíola. A via cutânea foi introduzida com comprovação científica por Edward Jenner, na vacinação contra o mesmo vírus. A introdução de seringas e agulhas foi realizada somente no século XIX nos experimentos de Pravaz, Rynd e Wood, e nos experimentos de vacinação de Pasteur, onde as agulhas de Pravaz foram utilizadas. No início do século XX, difundiu-se o uso de agulhas e seringas e a injeção dérmica passou a ser a via mais utilizada na administração de vacinas. Contudo, o uso desta técnica apresentou dificuldades entre a população, por ser um método invasivo, pela potencialidade da transmissão de doenças, pelo treinamento necessário aos trabalhadores da saúde e complexidade para o descarte dos materiais. Desta forma, no início do século XXI novas técnicas

livres de agulhas foram alvos de pesquisas para liberação de vacinas, onde se destacou a via de mucosa (Weninger & Papania 2008).

O sistema imunológico de mucosa das vias aéreas, cavidade oral, do trato digestivo e trato geniturinário são capazes de fornecer respostas contra patógenos que possuem como porta de entrada essas vias. Esse sistema é composto por várias células que são responsáveis por orquestrar tanto uma resposta imunológica inata quanto adaptativa. Dessa forma, além de produzir uma resposta imunológica aos patógenos invasores, também respondem a antígenos entregues na imunização (Lamichhane et al. 2014).

A entrega de antígeno à mucosa estimula tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa, com produção de muco e de anticorpos na superfície da mucosa que atuam como uma barreira inicial de defesa. Além disso, como o sistema imunológico de mucosa de recém-nascidos possuem a capacidade de responder a um antígeno, esta abordagem poderia ser utilizada principalmente em crianças, que possuem o sistema imunológico imaturo. Outro aspecto interessante é que as rotas de imunização nasal e oral são menos invasivas e de fácil administração (Shakya et al. 2016).

A produção de vacinas de mucosa é bastante promissora, por ser uma via de administração não invasiva e pela não utilização de agulhas, o que leva maior adesão à imunização. Contudo, a dificuldade em se obter uma formulação adequada ainda é um desafio para o desenvolvimento dessa abordagem. Estratégias envolvendo o uso de sistemas de liberação vêm sendo bastante empregadas (Yoshida 2012).

Existem diversos métodos de liberação de vacinas, sendo as micropartículas poliméricas as mais utilizadas, devido ao fato de serem biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, podem ser usados polímeros sintéticos, como o polietilenoglicol, ou naturais, onde a quitosana vem sendo explorada devido a sua característica de mucoadesividade e a capacidade de se adequar em diferentes formas e tamanhos (Zhao et al. 2014).

Na proposta desse trabalho, usou-se como estudo a *Neisseria meningitidis* sorogrupo C. Esta bactéria é um dos patógenos mais importantes, acometendo crianças e adultos. Infecções invasivas deste patógeno são causadoras de meningite e/ou meningococemia (doença meningocócica), sendo a meningite mais frequente com 50-70% dos casos. As manifestações da doença meningocócica ocorrem dentro de 1-14 dias após a infecção. Os sintomas representativos de meningite são: febre,

dor de cabeça, fotofobia, náuseas, rigidez na nuca, vômitos e alteração do estado mental. A meningococemia, manifestação severa da doença, apresenta-se por febre alta e manchas vermelhas na pele, sintomas que podem evoluir em poucas horas para choque séptico (Becka & Chacon-Cruz 2015).

Esta bactéria coloniza a nasofaringe, onde grande parte dos indivíduos podem ser portadores assintomáticos da bactéria e transmiti-la. No Brasil, a *N. meningitidis* do sorogrupo C é responsável por muitos surtos, com alta taxa de mortalidade e sequelas entre os sobreviventes. Desta forma a imunização exerce um papel importante no controle e na prevenção da doença (Bastos et al. 2015).

Dentro deste contexto, a proposta de uma formulação para uma vacina com a administração via mucosa contra a *N. meningitidis* do sorogrupo C pode ser de grande valia. Isto se deve ao fato desta bactéria ser um microrganismo que causa infecção a partir das vias aéreas, logo uma vacina com administração intranasal poderia ser a mais indicada.

1.1 Vacinas: um breve histórico

A vacinação possui grande importância na proteção contra doenças infecciosas. Estima-se que as primeiras tentativas de vacinação foram realizadas pelos chineses no tratamento da varíola, durante o século XI. Em 1796, Edward Jenner, verificou que o vírus da varíola bovina, poderia ser utilizado para prevenir o vírus da varíola em humanos e ainda, que o vírus era transmitido de um indivíduo para outro (Plotkin 2005).

No século XIX, Louis Pasteur e colaboradores contribuíram para o avanço no desenvolvimento de vacinas, formulando mais claramente a ideia de atenuação de patógenos a partir de experimentos com a bactéria *Pasteurella multocida*, causadora da cólera aviária. As primeiras abordagens de atenuação envolviam a exposição ao oxigênio e ao aquecimento, empregadas no desenvolvimento da vacina para raiva. Desde então, seu trabalho levou ao desenvolvimento de vacinas atenuadas para febre tifoide e cólera entre o final do século XIX e início do século XX (Plotkin 2014).

Neste cenário, começaram a surgir vacinas de subunidades, representadas pelas vacinas de toxóides, que poderiam ser combinadas com as demais vacinas. Com o avanço do cultivo de células *in vitro*, em 1955, Salk introduziu a vacina da pólio,

a partir do vírus inativado. Além disso, com o uso do cultivo de células foram desenvolvidas vacinas com vírus inteiro, entretanto não ofereciam segurança para os indivíduos. As vacinas amplamente utilizadas para infecções bacterianas, inicialmente eram produzidas diretamente a partir de culturas bacterianas inativadas pela ação do calor. Contudo, a inoculação dessas vacinas não possuía estudos clínicos seguros, fazendo com que a abordagem não fosse aceita. Deste modo, novos estudos para vacinas polissacarídicas foram realizados baseando-se no polissacarídeo purificado com alto peso molecular. Mas, estas vacinas eram pouco imunogênicas, logo, a fim de enfrentar este problema foi desenvolvida a vacina polissacarídica conjugada quimicamente com uma proteína (Figura 1.1) (Josefsberg & Buckland 2012; Karch & Burkhard 2016).

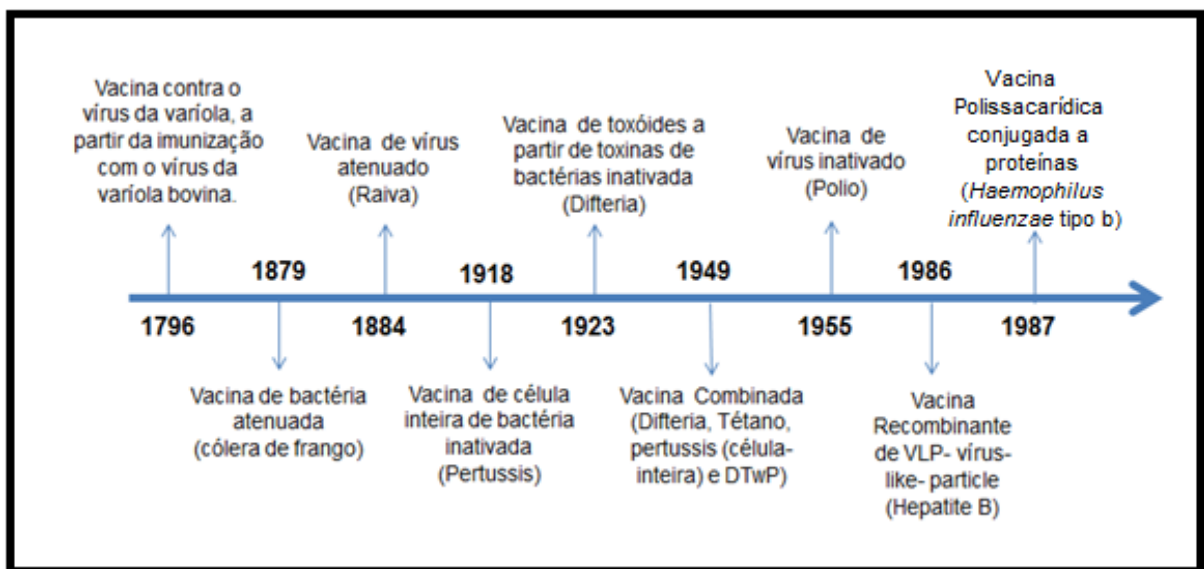


Figura 1.1: Desenvolvimento da produção de vacinas (Adaptada de Josefsberg & Buckland 2012).

As primeiras vacinas meningocócicas foram desenvolvidas em 1960, a partir da purificação de seus polissacarídeos capsulares. Em 1968, o Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed desenvolveu uma vacina polissacarídica contra *N. meningitidis* do sorogrupo C direcionada aos casos de doença nos campos de treinamento militares nos Estados Unidos. Este mesmo Centro de Pesquisa imunizou seus recrutas em 1982 com a vacina polissacarídica contra os sorogrupos A, C, W135 e Y. O uso destas vacinas demonstrou segurança e redução da doença nos Estados Unidos (Anderson et al. 2011).

Entretanto, os polissacarídeos não demonstraram boa imunogenicidade em crianças e baixa durabilidade de proteção. Baseando-se na bem-sucedida vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b, estudos se voltaram para a conjugação dos polissacarídeos a uma proteína carreadora, aumentando a resposta imunológica. Em novembro de 1999, a primeira vacina meningocócica C conjugada foi introduzida no programa nacional de imunização do Reino Unido. Em 2005, uma vacina conjugada quadrivalente contra os sorogrupos A, C, W135 e Y, foi licenciada e introduzida no programa de imunização dos Estados Unidos, a fim de proteger também adolescentes e adultos jovens. Desde então, diversos países utilizaram as vacinas conjugadas contra *N. meningitidis*, reduzindo a incidência de infecção (Vipond et al. 2012).

1.2 *Neisseria meningitidis*: patogênese e epidemiologia

Neisseria meningitidis é uma bactéria gram-negativa e se apresenta em forma de cocos, geralmente orientados em pares, sendo denominados diplococos (Figura 1.2). A *N. meningitidis* coloniza a superfície da mucosa da nasofaringe e atua como um patógeno oportunista humano. Estima-se que cerca de 5-10% da população mundial sejam portadores assintomáticos da bactéria em um determinado momento (Joshi et al. 2009).

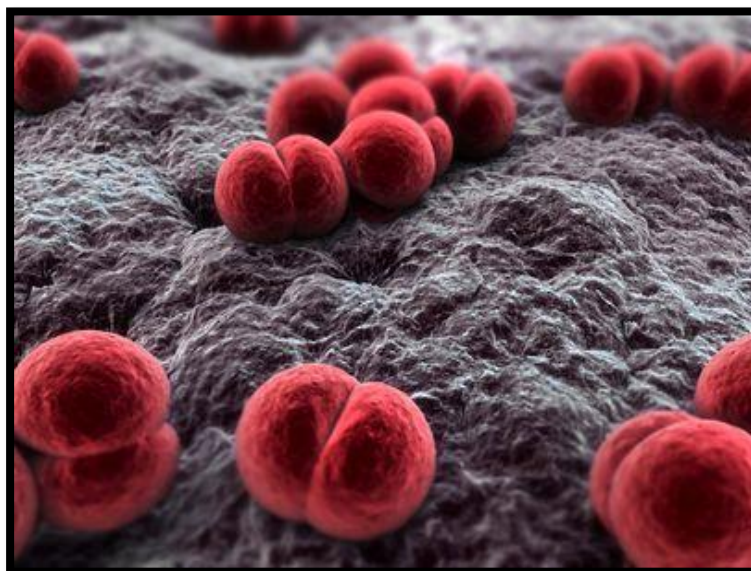


Figura 1.2: Imagem da bactéria *N. meningitidis*. <http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolscolleges/topics/microbial-genetics-1/human-pathogens-1/neisseria-meningitidis> acessado em 27/06/2017).

Após ultrapassar o epitélio nasal ou a barreira hematoencefálica a bactéria se replica rapidamente, podendo causar septicemia e meningite. Isto se deve, em grande parte, aos fatores de virulência presentes na membrana externa, como os lipopolissacarídeos e as proteínas de membrana (OMPs), os quais funcionam como porinas. Além desses, o pili possui grande responsabilidade na aderência, colonização e invasão; e a cápsula constitui um dos fatores de virulência mais importantes (Dwilow & Fanella 2015).

A cápsula bacteriana é uma estrutura extracelular, constituída por uma longa cadeia polissacarídica e tipicamente carregada negativamente. Desempenha um papel fundamental na invasão, possuindo propriedades de evasão do sistema imunológico do hospedeiro. As diferenças existentes nos polissacarídeos que constituem a cápsula são utilizadas para determinar os sorogrupos existentes (Raymond 2012; Willis & Whitfield 2013).

Dentre os treze sorogrupos descritos para *N. meningitidis*, cerca de 90% das infecções invasivas são causadas pelos sorogrupos A, B, C, W135, X e Y. A cápsula polissacarídica dos sorogrupos B e C são constituídas de homopolímeros de ácido siálico; nos sorogrupos Y e W135 são compostas por ácido siálico e D-glucose ou D-galactose, respectivamente; no sorogrupo A predomínio de N-acetilmanosamina-6-fosfato e; no sorogrupo X de N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato (Tabela 1.1) (Raymond 2012).

Tabela 1.1: Estrutura da cápsula polissacarídica dos seis principais sorogrupos de *N. meningitidis* (Adaptado de Willis & Whitfield 2013).

Sorogrupos	Unidades polissacarídicas repetidas
A	-6)-ManNAc- α -1-(PO ₄ -
B	-8)-NeuAc- α (2-
C	-9)-NeuAc- α (2-
W135	-4)-NeuAc- α (2,6)-Gal- α (1-
Y	-4)-NeuAc- α (2,6)-Glc- α (1-
X	-4)-GlcNAc- α -1-(PO ₄ -

1.2.1 Epidemiologia e o impacto das vacinas contra *Neisseria meningitidis*

A doença meningocócica pode ocorrer em casos isolados ou em surtos. A maior incidência da doença está entre crianças menores de 1 ano de idade, jovens e adultos jovens. Em surtos, a taxa de incidência da doença pode aumentar em outros grupos etários e pode ser associado a ambientes onde há aglomeração e contato entre as pessoas, como as escolas, por exemplo. Além disso, outros fatores favorecem o aparecimento da doença, como fatores socioeconômicos e a virulência das cepas (Dwilow & Fanella 2015).

A ocorrência da doença é dada pela distribuição dos sorogrupos geograficamente. Nos países industrializados, como na Europa e nas Américas, por exemplo, há prevalência dos sorogrupos B, C, Y e W135, enquanto que no continente Africano e partes da Ásia, o sorogrupo A é o mais atuante (Stefanelli et al. 2015).

Na África, no “*cinturão das meningites*”, como é conhecida a região subsaariana, ao longo do leste da Etiópia ao oeste do Senegal, houve vários casos relacionados com o sorogrupo A no período de 2007 a 2009. Embora a incidência do sorogrupo C não seja muito expressiva nesta região, nos anos de 2013 e 2014 dois surtos foram relatados de cepas oriundas de outros países. No período de 2006 a 2010 também foram observados surtos do sorogrupo X em países como Nigéria e Uganda (Bosis et al. 2015).

Na Europa, os sorogrupos B e C são os principais responsáveis pela ocorrência de doenças meningocócicas. Contudo, casos da doença ocasionados pelo sorogrupo Y vêm sofrendo um significativo aumento entre os jovens. A inclusão de vacinas contra os principais sorogrupos foi de grande importância, pois auxiliou no controle e na diminuição dos casos nas regiões afetadas no continente (Stefanelli et al. 2015).

Casos relacionados ao sorogrupo W vem sendo relatados na Turquia, África do Sul, Nigéria, Argentina, Chile e no Brasil, com maior incidência em adolescentes e crianças menores de 1 ano. As manifestações clínicas relatadas em infecções deste sorogrupo são atípicas, como pneumonia, endocardite, artrite séptica e epiglote. Contudo, casos fatais de adolescentes apresentaram predominantemente sintomas gastrointestinais, como náusea, vômito e diarreia. Esses sintomas, que não são usualmente característicos da doença meningocócica, acarretam o diagnóstico tardio e evolução para a morte dos pacientes (Campbell et al. 2016).

No Brasil a doença é endêmica, com ocorrência de surtos em algumas regiões, onde os sorogrupos B e C ocorrem em mais de 90% entre os demais sorogrupos. Desde 2005, surtos do sorogrupo C vem sendo relatados, com elevada taxa de mortalidade e prevalência entre crianças menores de 2 anos, com cerca de 8 casos/100.000 habitantes. Em determinadas regiões do país, a incidência da doença meningocócica relacionada ao sorogrupo C chega a cerca de 90%, enquanto que do sorogrupo B chega apenas a 31% como se pode observar na Figura 1.3 (Tauil et al. 2014; DATASUS 2016).

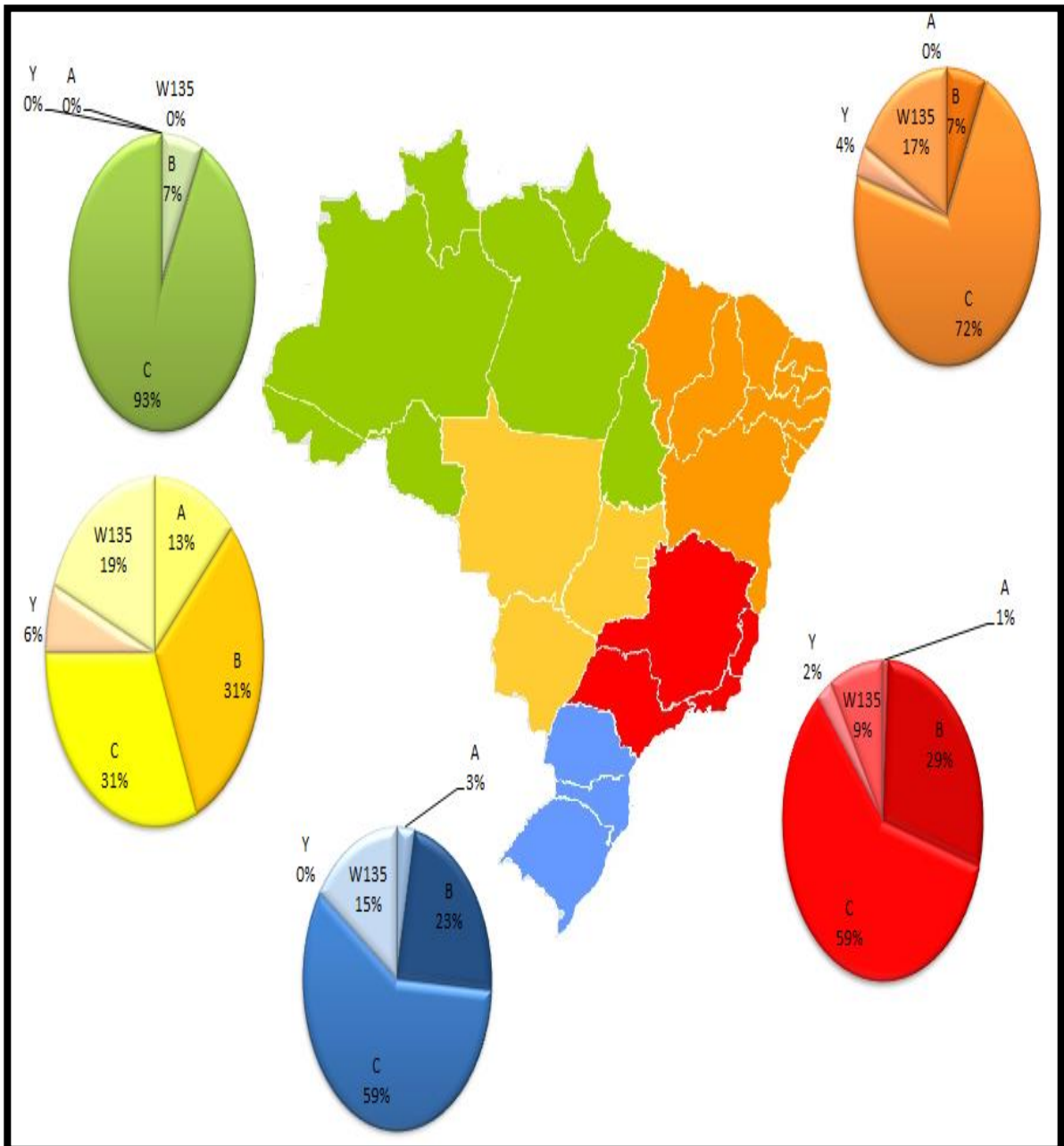


Figura 1.3: Distribuição dos sorogrupos de *N. meningitidis* por região no Brasil-Dados de 2015 (DATASUS 2016).

Desta forma, estratégias de prevenção têm grande importância para o controle e diminuição dos casos de doença meningocócica, como a implementação da vacinação nestes países. Neste contexto, o Brasil introduziu em seu programa de vacinação a vacina meningocócica do sorogrupo C conjugada para crianças menores de dois anos de idade, faixa na qual ocorre maior incidência da doença. Contudo, nos demais países onde também há vacinação para esse sorogrupo, as faixas etárias de vacinação também incluem os adolescentes e adultos jovens, tendo sido observado uma redução significativa na incidência de casos da doença nos grupos etários não cobertos pela vacinação (Soarez et al. 2011; Tauil et al. 2014).

No Brasil, um estudo realizado entre adolescentes (11-19 anos) na cidade de Campinas demonstrou uma taxa de 9,9% de portadores, com prevalência do sorogrupo C e maior predominância em indivíduos com idade entre 17-19 anos. Sendo assim, a definição de um esquema de imunização para os grupos etários específicos e a avaliação de seu impacto se fazem necessários para efeito da proteção de rebanho, garantindo o controle contra *N. meningitidis* sorogrupo C. Desta forma, indivíduos não vacinados também são protegidos devido à redução da transmissão da bactéria por aqueles que receberam a vacina, mecanismo denominado imunidade de rebanho (Joshi et al. 2009; Pollard et al. 2009).

1.3 Vacinas contra *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C

A vacina contra *N. meningitidis* ideal deveria abranger todos os sorogrupos. Apesar dos avanços no desenvolvimento de vacinas, um antígeno universal não é viável frente às diferenças estruturais dos polissacarídeos constituintes da cápsula bacteriana. Dentre as vacinas disponíveis comercialmente para o sorogrupo C estão a vacina conjugada monovalente e quadrivalente, a vacina polissacarídica e a vacina conjugada meningocócica C combinada com *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), sendo todas desenvolvidas a partir da abordagem de vacinas polissacarídicas e de vacinas conjugadas (Tabela 1.2) (Yezli et al. 2015).

Tabela 1.2: Principais vacinas Conjugadas e Polissacarídicas disponíveis comercialmente contra *N. meningitidis* do sorogrupo C (Adaptada de Borrow et al. 2013).

	Vacina	Composição da Vacina
Vacina conjugada monovalente	Men C Menjugate® (MCC-CRM ₁₉₇ , Novartis)	Vacina monovalente, constituída de um oligossacarídeo derivado do sorogrupo C conjugado com a proteína carreadora CRM ₁₉₇ derivada do toxóide diftérico.
	Meningitec® (MCC-CRM ₁₉₇ , Wyeth/Pfizer)	Vacina monovalente, constituída de um oligossacarídeo derivado do sorogrupo C conjugado com a proteína carreadora CRM ₁₉₇ derivada do toxóide diftérico.
	NeisVac-C® (MCC-TT, Baxter)	Constituída de oligossacarídeo de-O- acetilado conjugado diretamente com toxóide tetânico. Estudos clínicos com a vacina demonstraram maior imunogenicidade do que as duas conjugadas com CRM ₁₉₇ (Menjugate e Meningitec)
Vacina conjugada quadrivalente	Men C Menactra® (quadrivalente, MCV4, Sanofi Pasteur)	Vacina quadrivalente contendo os sorogrupos A, C, Y e W135 conjugada ao toxóide diftérico. Licenciada para uso em indivíduos com idade entre 2 e 55 anos nos Estados Unidos e Canada.
	Menveo® (vacina quadrivalente, MenACWY-CRM ₁₉₇ , Novartis)	Vacina quadrivalente contendo os sorogrupos A, C, Y e W135 conjugada a CRM ₁₉₇ . Licenciada para uso em adolescentes e adultos.
	Nimenrix® (quadrivalente, MenACWY, GlaxoSmithkline)	Vacina quadrivalente contendo os sorogrupos A, C, Y e W135 conjugada ao toxóide tetânico. Licenciada na Europa para uso em crianças de até 12 meses de idade e demonstra boa imunogenicidade em adultos e crianças.
Outras Vacinas conjugada e polissacarídica	Menitorix® (MCC-TT/Hib-TT, GlaxoSmithkline)	Preparada a partir da conjugação dos polissacarídeos de Hib e Men C com o toxóide tetânico
	Vacina Polissacarídica (quadrivalente, MPSV4-Menomune®, Sanofi-Pasteur)	Vacina contendo os sorogrupos A, C, Y e W135. Vacina polissacarídica para o sorogrupo C não é imunogênica em crianças. Efetiva para crianças acima de 2 anos de idade e para adultos.

1.3.1 Vacinas Polissacarídicas x Vacinas Conjugadas

As vacinas polissacarídicas são vacinas compostas de longas cadeias de moléculas de açúcar presentes na cápsula bacteriana. Estas vacinas induzem a produção de anticorpos contra o polissacarídeo capsular. Entretanto, a resposta imunológica contra estes antígenos é independente de células T. Os antígenos interagem com as células B para produção de anticorpos, pois devido à natureza do antígeno não-proteica, estes não são processados por células apresentadoras de antígenos, sem o auxílio das células T (Siadat & Norouzian 2007).

Devido a esta resposta imunológica característica, estas vacinas possuem imunogenicidade reduzida em crianças menores de 2 anos. O sistema imunológico de crianças nesta faixa etária ainda não alcançou a maturidade, não possuem todas as células B formadas, desta forma não há resposta imunológica a vacinas polissacarídicas. Além disso, estas não induzem a produção de células de memória nos indivíduos (Criado et al. 2008).

As vacinas conjugadas produzem uma resposta imunológica prolongada e mais eficaz. Atualmente, as vacinas conjugadas licenciadas são obtidas pela ligação covalente do polissacarídeo a uma proteína carreadora a partir de métodos químicos. Desta forma, há formação de epítopos de células T, que interagem com as células T CD4 aumentando a resposta do anticorpo ao polissacarídeo conjugado, estimulando a produção de anticorpos do isotipo IgG e de células B de memória, mesmo em crianças menores de 2 anos (Tabela 1.3) (Frasch et al. 2015).

Tabela 1.3: Avaliação da resposta imunológica de vacinas polissacarídicas e de vacinas conjugadas (Adaptado de Ali et al. 2014).

Característica	Vacina Polissacarídica	Vacina Conjugada
Imunogenicidade em crianças	Baixa	Alta
Imunogenicidade em adultos	Alta	Alta
Avidez	Baixa	Alta
Indução de memória imunológica	Não	Sim
Duração da proteção	Curta	Moderada

Apesar das desvantagens das vacinas polissacarídicas, estas ainda continuam sendo usadas em alguns países para casos de surtos. Na China, a vacina bivalente

para os sorogrupos A e C foi introduzida em 2005 após um surto relacionado ao sorogrupo C. Já as vacinas conjugadas, são amplamente utilizadas e possuem grande importância na prevenção da doença meningocócica. Desde 1999, com a introdução da vacina conjugada para o sorogrupo C, muitas vacinas foram licenciadas em diversos países (Ali et al. 2014).

1.3.2 Vacina Meningocócica C Brasileira

Visando atender a situação endêmica brasileira, a Fundação Oswaldo Cruz, no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), desenvolveu uma vacina conjugada contra o sorogrupo C, que demonstrou elevados padrões de imunogenicidade, comparada às vacinas já licenciadas.

Muitos métodos químicos podem ser empregados para a obtenção do conjugado polissacarídeo-proteína. Esta vacina foi obtida a partir da metodologia de aminação redutiva modificada, proporcionando a reação química entre o polissacarídeo meningocócico C oxidado com periodato de sódio e a proteína monomérica tetânica ativada com cloridrato de hidrazina, como proteína carreadora (Silveira et al. 2007).

A metodologia de aminação redutiva pode ser utilizada em moléculas contendo aldeídos ou cetonas com os grupamentos amina da proteína. Em meio aquoso, principalmente em pH alto, há formação das bases de *Schiff* entre os grupamentos aldeído e amino, que são posteriormente reduzidas com o auxílio de agentes redutores. Desta forma, a ligação fica estável em ambientes aquosos, protegidos de ligações cruzadas. Contudo, este método leva um extenso tempo de formação do conjugado, o que representa uma desvantagem para o processo (Hermanson 2008).

Observando esta desvantagem da metodologia, Bio-Manguinhos utilizou a estratégia da aminação redutiva modificada para o desenvolvimento da vacina. Neste método a proteína sofre uma modificação a partir da introdução de grupamentos de hidrazida na estrutura, pelo tratamento com cloridrato de hidrazina. Estes grupos reagem com os grupamentos aldeídos presentes no polissacarídeo, gerados pela oxidação do mesmo com periodato de sódio. Esta técnica diminui o tempo de reação de conjugação, o que viabiliza o processo e aumenta a eficiência da reação (Figura 1.4) (Silveira et al. 2007).

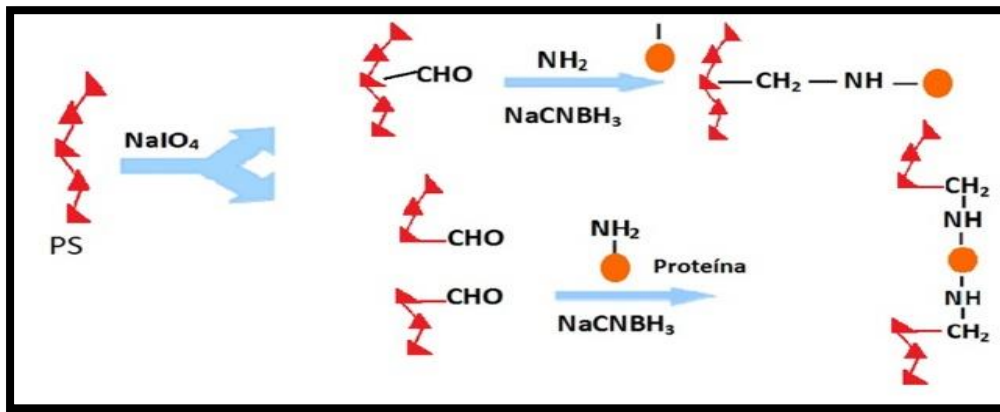


Figura 1.4: Esquema da reação de conjugação utilizando a metodologia de aminação redutiva modificada (Souza 2011).

A fim de proporcionar uma imunidade de rebanho, reduzindo o número de portadores assintomáticos e conseqüentemente a transmissão do microrganismo, a população alvo a ser imunizada por essa vacina é de crianças, adolescentes e adultos jovens. Estudos de fase I em adultos e fase II em crianças de 1 a 9 anos, demonstraram segurança e imunogenicidade (Martins et al. 2010; Engstrom et al. 2012). O estudo de fase II/III ainda será realizado no ano de 2017. A fim de aprimorar a resposta imunológica da vacina, pesquisas voltadas para estratégias de formulação para novas vias de administração podem ser de grande auxílio.

1.4 Sistema Imunológico de Mucosa

O sistema imunológico de mucosa é constituído por tecidos integrados, células imunológicas, anticorpos, quimiocinas e citocinas. Essas moléculas atuam na resposta imunológica inata e adaptativa em infecções e na liberação de antígenos durante a imunização. Pode ser dividido em dois componentes: sítios indutivos e efetores (Lamichhane et al. 2014).

Nos sítios indutivos ocorre a ativação inicial das células do sistema imunológico, após o contato com o patógeno. São constituídos por tecidos linfóides associados à mucosa (MALTs), compreendido por componentes específicos de cada sítio efetor, como o tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT), na mucosa nasofaríngea e o tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), na mucosa bronquial, por exemplo. Além disto, os tecidos linfóides possuem células imunológicas importantes, como os linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos (APCs), que são requeridos para o início da resposta imunológica específica ao antígeno (Chadwick et al. 2010).

O sítio efetor é constituído pela região da lamina própria (LP), onde ocorre a resposta imunológica mediada por células e a produção de anticorpos, principalmente do isotipo IgA, atuando como um anticorpo neutralizante. O IgA possui um papel fundamental na prevenção de infecções, através da inibição da adesão de patógenos à superfície da mucosa (Pavot et al. 2012).

Outra característica importante nas mucosas é a presença de células membranosas, as células M. Estas células se encontram na camada epitelial dos tecidos da mucosa e atuam na captura do antígeno. Os antígenos são capturados na superfície da mucosa pelas células M e transferidos para a região sub epitelial, onde se encontram as células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente células dendríticas. Estas células processam o antígeno e os apresentam aos linfócitos T, que iniciam a resposta imunológica específica ao antígeno. Além disso, a interação entre as APCs e o antígeno, produzem a liberação de citocinas e quimiocinas que estimulam a secreção de anticorpos IgA pelas células B. Essa classe de anticorpos é de grande importância, pois promovem o aprisionamento do antígeno, prevenindo o contato direto com a mucosa (Figura 1.5) (Lamichhane et al. 2014).

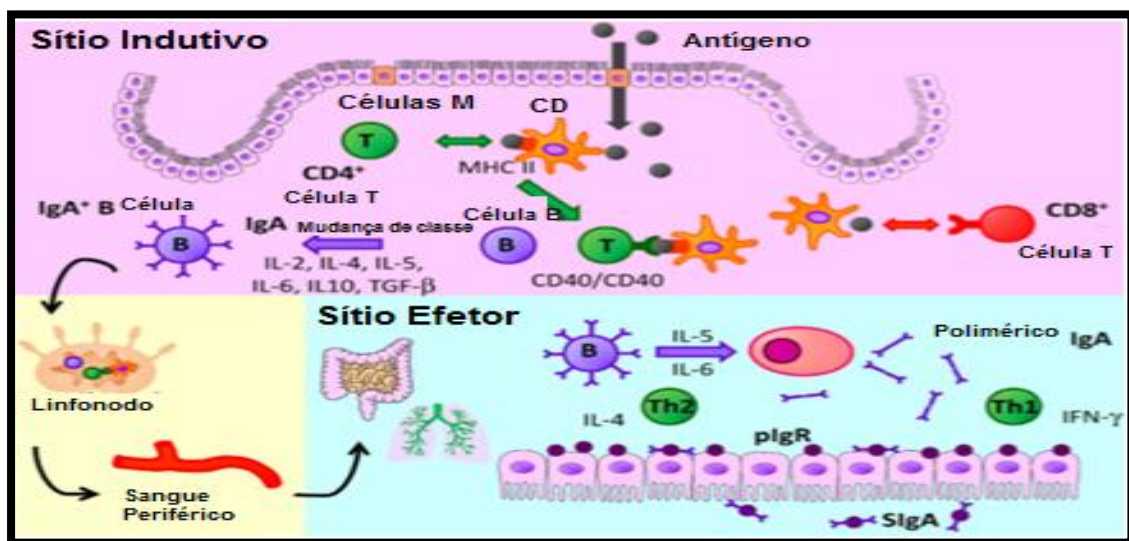


Figura 1.5: Esquema exemplificando a resposta imunológica de mucosa a um antígeno (Lamichhane et al. 2014).

1.4.1 Abordagens para vacinação de mucosa

A mucosa é a principal via de entrada no organismo para a maioria dos patógenos, desta forma vacinas que atuem eficientemente nesses sítios são alvos de pesquisa. A vacinação de mucosa oferece muitas vantagens em relação às demais:

facilidade na administração, maior adesão dos pacientes e estimulação do sistema imunológico local e sistêmico (Chadwick et al. 2010).

Entre as vias de administração em mucosa, a nasal é a mais promissora para abordagens de vacinação. Comparada as demais vias, a mucosa nasal possui atividade enzimática reduzida, epitélio permeável e maior eficiência na indução de produção de anticorpos do isotipo IgA (Borges et al. 2008; Csaba et al. 2009).

Apesar dessas vantagens, o desenvolvimento de vacinas de mucosa tem ocorrido de forma lenta e há poucas licenciadas para uso em humanos, como por exemplo, a vacina oral da poliomielite e a vacina de Influenza atenuada (FluMist®) intranasal licenciada em 2004, nos Estados Unidos. Este cenário se deve às dificuldades no desenvolvimento de formulações adequadas, o que inclui os sistemas de liberação e os adjuvantes (Xia et al. 2015). Na Tabela 1.4 podem-se verificar as vacinas de mucosa disponíveis no mercado, as quais demonstraram significativo sucesso na prevenção de doenças.

Tabela 1.4: Vacinas de mucosa licenciadas (Adaptado de Lycke 2012).

Vacina	Nome comercial (Fabricante)	Dosagem	Administração	Eficácia
Vírus Influenza tipo A e B	FluMist (MedImmune)	2 doses (em crianças)	Intranasal	>85% em crianças, variável em adultos.
Vírus Influenza H1N1(gripe suína)	NASOVAC (Serum Institute of India)	1 - 2 doses	Intranasal	Não avaliado
Rotavirus	RotaTeq (Merck); Rotarix (GlaxoSmithkline)	3 doses	Oral	70 - 90% contra doenças severas.
Poliovírus	Diversos	3 doses	Oral	>90% na maior parte do mundo.
<i>Salmonella</i> <i>typhi</i>	Vivotif (Crucell); Ty21A	3 - 4 doses de Ty21A	Oral	Variável, mas >50%.
<i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>	Orochol (Crucell)	Dose única	Oral	Baixa efetividade nos testes clínicos
Cólera	Dukoral (Crucell); Shanchol (Shantha Biotechnics)	2 - 3 doses	Oral	Forte imunidade de rebanho; >60% de 3 -5 anos.

A vacina de mucosa ideal deve simular a entrada dos patógenos pela mucosa. Entretanto diversos fatores limitam a entrega das vacinas à mucosa, como por exemplo, baixa absorção e degradação por enzimas. O uso de nano ou micropartículas no desenvolvimento de sistemas de liberação é uma das estratégias mais atrativas para o encapsulamento de antígenos vacinais (Renukaradhy et al. 2015).

A associação do antígeno com a partícula é de suma importância para o sucesso do sistema de liberação. Este processo pode ser realizado por diversos métodos, como a adsorção física, a conjugação química e o encapsulamento. A adsorção baseia-se na interação hidrofóbica ou através das cargas das moléculas. Na conjugação química, o antígeno é quimicamente ligado à partícula. Já no encapsulamento, os antígenos são misturados com as substâncias iniciais formadoras da partícula, obtendo-se o encapsulamento do antígeno (Figura 1.6) (Zhao et al. 2014).

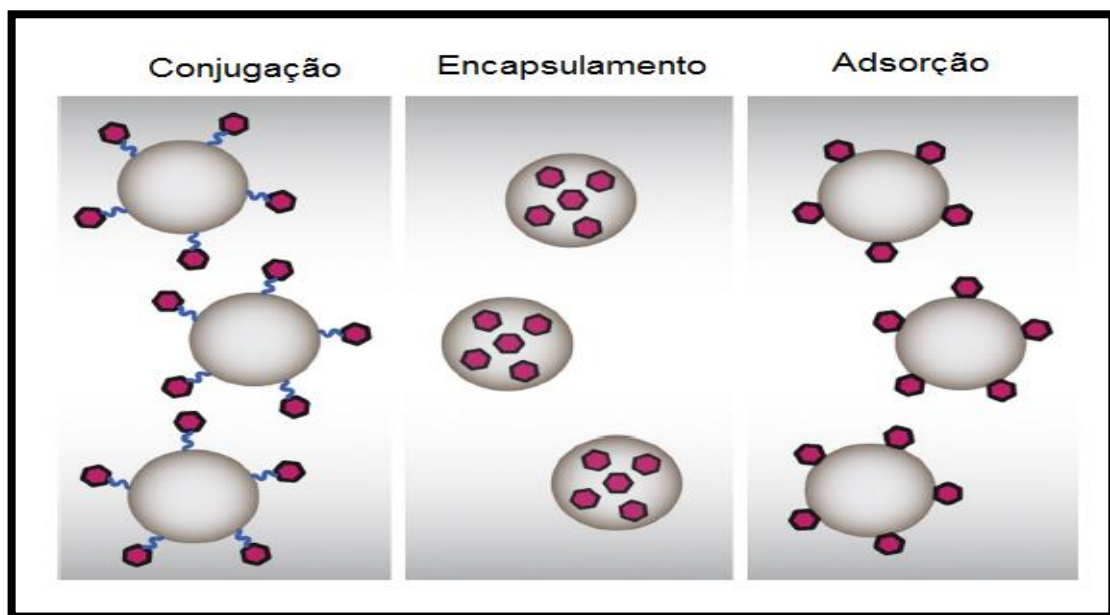


Figura 1.6: Representação da interação das micropartículas com o antígeno (Adaptado de Zhao et al. 2014).

Há uma variedade de sistemas de liberação de partículas e, dependendo da metodologia escolhida é possível desenvolver nano ou micropartículas. Dentre as metodologias encontram-se as emulsões, os lipossomas e os sistemas poliméricos (Tabela 1.5) (Cordeiro et al. 2015).

Tabela 1.5: Principais sistemas de liberação de partículas (Adaptado de Faraji & Wipf 2009; Gill 2013; Kim et al. 2014; Zhao et al. 2014).

Tipo de sistema	Características	Exemplos
Lipossomas	São vesículas concêntricas envolvidas por uma membrana fosfolipídica. Podem carregar e liberar tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas.	Catiônicos; sensível ao pH
Emulsões	Dispersões de dois ou mais líquidos imiscíveis. Pode funcionar também como um adjuvante.	Água em óleo; óleo em água (ex. adjuvante MF59, produzido pela Novartis)
Sistema baseado em polímeros	A maioria dos polímeros utilizados é biodegradável e biocompatível. Podem ser realizadas modificações químicas em sua superfície. Podem ser utilizados polímeros sintéticos ou naturais.	Quitosana; Gelatina; PBAE (poli- β - amino ester)

Dentre as abordagens de sistemas de liberação descritas para formação de nano e micropartículas, os polímeros vêm sendo amplamente utilizados para desenvolvimento de novos métodos de administração de vacinas. A quitosana é o polímero natural mais empregado, devido ao baixo custo, biocompatibilidade e versatilidade em diferentes formulações. Apesar de muito utilizada, preparações de partículas de quitosana não são simples, algumas características físico-químicas devem ser consideradas, pois podem afetar toda formulação resultante. Dentre esses fatores pode-se citar o peso molecular, o grau de desacetilação, pH e concentração (Xia et al. 2015; Rázga et al. 2016).

1.4.2 Quitosana

Quitosana é um polissacarídeo com grupamentos amino (poli-1,4-D-glucosamina) obtido pela desacetilação alcalina da quitina, que também é um polissacarídeo. A quitina é encontrada no exoesqueleto de crustáceos, insetos e fungos, e o grau de desacetilação, o peso molecular e as modificações químicas introduzidas são responsáveis pelas características físico-químicas da quitosana,

como a solubilidade, por exemplo. Em soluções ácidas, a quitosana assume uma conformação carregada positivamente, sendo solúvel, e em soluções alcalinas e neutras se apresentam na forma insolúvel (Figura 1.7) (Dutta et al. 2004; Kumar et al. 2016).

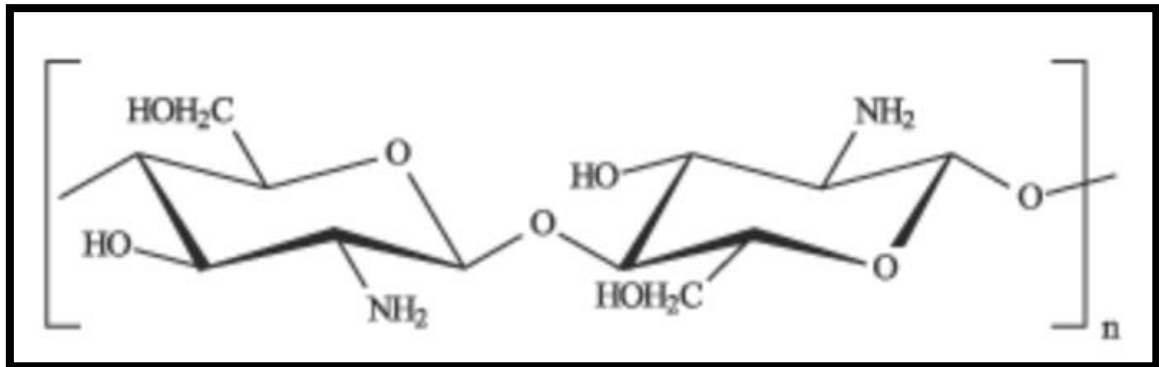


Figura 1.7: Estrutura química da quitosana (Assis & Silva 2003).

Devido a sua biocompatibilidade e segurança, a quitosana foi licenciada para uso alimentício no Japão, Itália e Finlândia. Além disso, sua utilização na reparação de cartilagens e de tecidos vem sendo alvo de muitas pesquisas. Sua característica não irritante e atóxica já está descrita em diferentes documentos, como a Farmacopeia Europeia 6.0 e a Farmacopeia Americana- USP 34 (Casettari & Illum 2014).

Outra característica importante da quitosana é a sua mucoadesividade. As cargas positivas da quitosana interagem com os resíduos de ácido siálico presente na superfície da mucosa de forma eletrostática. Além disso, auxilia na absorção de antígenos, pois afeta a permeabilidade da membrana epitelial provocando a abertura das junções entre as células epiteliais. Devido a estes fatores, o uso de microesferas de quitosana vem sendo explorado em diferentes sistemas de liberação e tem demonstrado boa eficiência *in vivo* (Tabela 1.6). Desta forma a quitosana tem aplicação proposta neste trabalho (Mouez et al. 2014).

Tabela 1.6: Avaliação *in vivo* de algumas nanovacinas baseadas em quitosana. (Adaptado de Cordeiro et al. 2015).

Sistema	Antígeno	Rota de administração	Eficácia de resultados <i>in vivo</i>
Nanopartículas	Ovalbumina (OVA)	Intramuscular (IM), Intranasal (IN)	Após imunização IM (1 dose), as nanopartículas induziram maior título de IgG e aumentaram a captação pelas células dendríticas e ativação. Imunização IN (2 doses) induziu elevados e balanceados níveis de IgG e IgA.
		Intraduodenal	Nanopartículas de quitosana (2 doses), aumentaram os níveis de IgG e induziram a maturação de células dendríticas.
	Hemaglutinina	Intranasal (IN)	Duas doses da nanovacina induziram altos níveis de IgA e IgG, aumento da produção de IFN- γ (resposta celular) e da sobrevivência no desafio animal em até 100%.
Nanocápsulas	Antígeno de superfície da hepatite C recombinante (rHBsAg)	Intramuscular (IM), Intranasal (IN)	Uma dose IM do protótipo vacinal induziu níveis de IgG similares as duas doses do antígeno absorvido com alumínio. Através da rota IN, houve um aumento da resposta imunológica baseada em Th1.
Lipossomas	Plasmídeos codificantes HBsAg	Intranasal (IN)	Lipossomas com quitosana (2 doses) promoveram um aumento nos níveis de IgA nas secreções nasal, vaginal e salivar em comparação com controles.

1.5 Justificativa

Neisseria meningitidis, bactéria causadora da doença meningocócica invasiva, é uma das responsáveis pelas altas taxas de mortalidade, chegando a aproximadamente 10% de casos fatais em países desenvolvidos, especialmente em crianças menores de 2 anos. Globalmente, os casos da doença estão associados aos diferentes sorogrupos de *N. meningitidis*. No Brasil, a predominância do sorogrupo C chega a cerca de 90% em determinadas regiões. Atualmente o controle e a profilaxia contra esta bactéria são realizados por vacinas injetáveis.

Apesar da eficiência do sistema imunológico de mucosa, poucas são as vacinas que fazem o uso desta administração. As vacinas aplicadas pela mucosa têm o potencial de oferecer uma melhor resposta imunológica, pois estimulam uma resposta imunológica local e sistêmica. Como a *N. meningitidis* é um microrganismo que causa infecção a partir das vias aéreas, a administração intranasal poderia ser a mais indicada.

Deve-se ressaltar também a facilidade de aplicação, a maior aceitação dos pacientes e a diminuição dos riscos de contaminação, potencialmente proporcionadas pela não utilização de agulhas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Propor uma formulação intranasal para a vacina meningocócica C conjugada desenvolvida em Bio-Manguinhos.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a eficiência de encapsulamento do antígeno vacinal em diferentes concentrações de quitosana;
- Caracterizar a formulação obtida;
- Verificar a preservação da identidade do antígeno após a formulação;
- Avaliar a imunogenicidade a partir da formulação proposta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos

Todos os equipamentos utilizados possuem procedimentos operacionais descritos e são qualificados periodicamente de forma a garantir as boas práticas de laboratório.

- Agitador magnético, marca Ika; modelo Mini MR;
- Centrífuga, marca Eppendorf; modelo 5415D;
- Espectrofotômetro, marca TECAN; modelo Sunrise, com “Magellan software” para fornecimento dos dados;
- Refrigerador, marca Consul; modelo compacto 120;
- Estufa, marca FANEN; modelo 502;
- Balança analítica Sartorius; modelo LA1200S;
- Medidor de pH- Metrohm, pH lab 827;
- Espectrômetro RMN 400MHz – BRUKER Avance Spectrometer;
- Analisador de partículas por difração a laser, faixa de medição 0,03 – 1000 μm , SALD-2201- SHIMADZU;
- Termobloco VWR Scientific Products; Heatblock II 949036;
- Analisador de potencial zeta – Zeta plus- Brookhaven Instruments;
- Lavadora automática de placas – Skan Washer 300, Molecular Devices;
- Leitor de placas – Tecan infinite- Nanoquant M 200 Pro, com “Magellan software” para fornecimento dos dados;
- Microscópio Eletrônico de Varredura- Duplo feixe Lyra- Tescan - República Tcheca;
- Centrífuga Centra CL2- Thermo Electron Corporation.

3.2 Materiais

- Béquer 50 mL;
- Barra magnética;
- Tubo cônico de 1,5, 15 e 50 mL;
- Pipetas descartáveis de 2, 5, 10 e 25 mL;
- Micropipetas 1000, 200, 10 μ L;
- Ponteiras para micropipetas;
- Membrana de nitrocelulose;
- Placas de ELISA Immulux HB, 96 orifícios- Dynex;

3.3 Reagentes

- Quitosana \geq 75% desacetilada, Sigma Aldrich- Life Science;
- Tween 80, Merck;
- Ácido acético, Merck;
- Citrato de Sódio, Merck;
- Cloreto de sódio, VETEC;
- PMSF- Phenylmethylsulfonyl fluoride;

3.4 Antígeno

- Insumo farmacêutico ativo (IFA) da vacina Meningocócica C Conjugada, pertencente ao lote 166EMPCT01. A concentração de proteínas obtida neste lote foi de 2,48 mg/mL, realizada pelo método de Lowry, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como referência (Lowry et al. 1951). A concentração de ácido *N*-acetilneuramínico (NANA) obtida foi de 1,29 mg/mL, obtida por meio do método

espectrofotométrico, utilizando como referência o NANA comercial, fornecido pela Sigma (Svennerholm 1957). O IFA foi fornecido pelo laboratório de Tecnologia Bacteriana, localizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos- Bio-Manguinhos, Fiocruz.

3.5 Metodologia

3.5.1 Preparação das partículas de quitosana

As partículas de quitosana foram obtidas a partir da metodologia de coacervação, com base nos trabalhos de Borges et al. 2008 e Koppolu et al. 2014. Para isto foram utilizadas duas soluções: a solução de quitosana e a solução de citrato de sódio 50 mM contendo o antígeno.

A solução do polímero foi preparada a partir da dissolução de quitosana $\geq 75\%$ desacetilada em solução de ácido acético 1% (v/v), adicionada de 1% (p/v) de tween 80. Para solubilização da quitosana, foi necessário o uso de aquecimento brando (aproximadamente 60°C) e agitação a 900 rpm. Após o seu resfriamento, o pH foi ajustado para $5,0 \pm 0,2$ com solução de NaOH 0,2 M. A fim de avaliar a proporção ideal de quitosana para o encapsulamento, foram preparadas as concentrações de 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v).

A segunda solução foi preparada pela adição do IFA da vacina meningocócica C conjugada à solução de citrato de sódio 50 mM (citrato-antígeno), a fim de se obter uma concentração final de antígeno de 0,32 mg/mL em um volume de formulação total de 8 mL. Desta solução final foi reservada uma amostra para quantificação de proteínas.

As partículas de quitosana associadas ao antígeno foram formadas a partir do gotejamento lento da solução de citrato-antígeno à solução de quitosana contida em um béquer de 50 mL. A quantidade de solução de quitosana foi suficiente para um volume total de 8 mL de formulação. Esta adição foi realizada sob agitação média de 900 rpm, permanecendo constante por um período de 1 hora, utilizando agitador IKA mini. Todo o processo ocorreu em temperatura ambiente.

Após o período de agitação, as partículas formadas foram distribuídas em tubos cônicos de 1,5 mL e centrifugadas na centrífuga Eppendorf a 2300 rcf (5000 rpm) por 30 minutos. O sobrenadante foi reservado para quantificação de proteínas e, as partículas ressuspensas em solução de cloreto de sódio 0,2 M (Figura 3.1). As suspensões obtidas foram estocadas sob refrigeração (2-8°C) até o momento do uso. Todas as formulações foram realizadas em duplicatas.

Foi utilizado um teste branco, substituindo o antígeno por água deionizada, mantendo as demais condições experimentais.

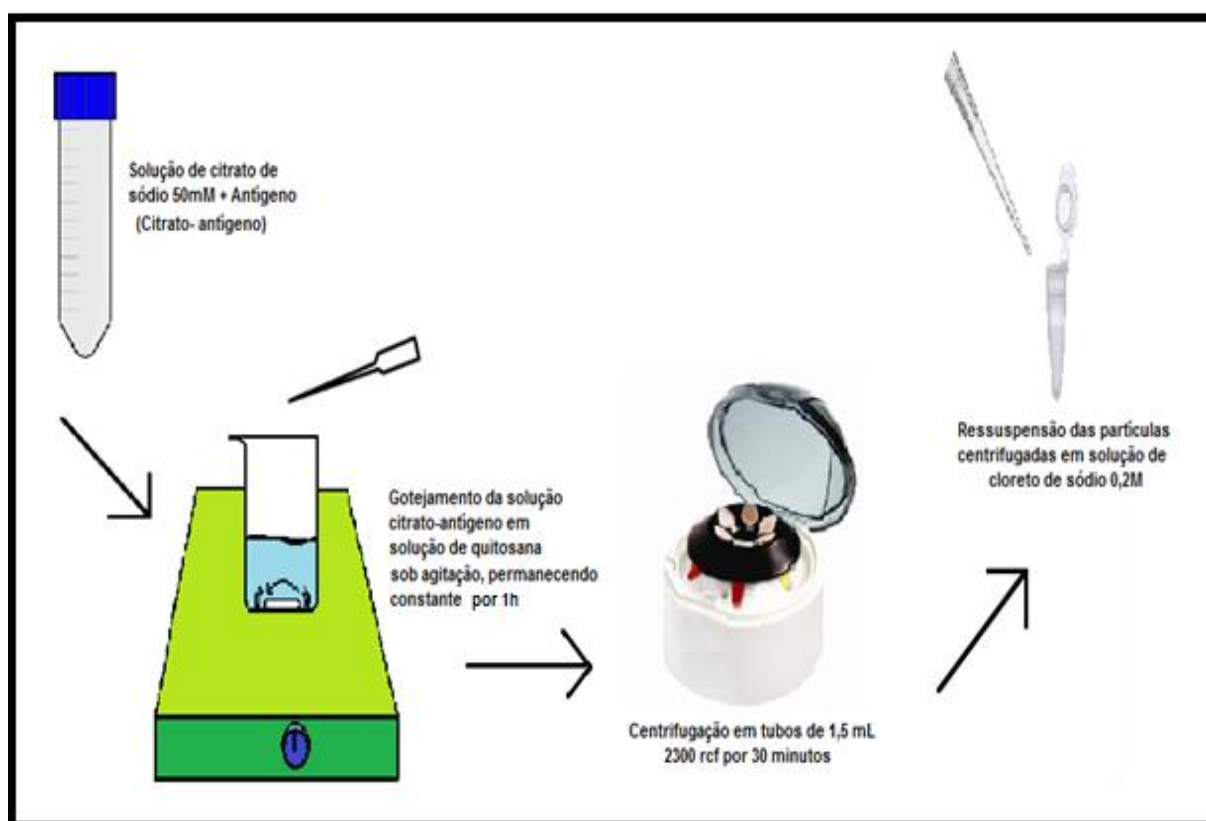


Figura 3.1: Esquema de preparo das partículas formadas pelo encapsulamento do insumo farmacêutico ativo da vacina meningocócica C conjugada com o polímero quitosana.

3.5.2 Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas foi verificada a partir da metodologia de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit- Thermo Fisher Scientific) de acordo com as normas estabelecidas pelo fabricante Thermo scientific (Smith et al. 1985).

Este método baseia-se na reação de biureto, onde o íon Cu^{+2} é reduzido a Cu^{+1} pela proteína em meio alcalino. Esta redução é detectada colorimetricamente a partir do reagente BCA, com alteração da coloração da amostra para roxo e detecção a 562 nm em espectrofotômetro. A quantidade de Cu^{+2} reduzido é proporcional à concentração da proteína, tomando como referência o padrão de albumina bovina sérica (BSA).

3.5.3 Avaliação da Eficiência de Encapsulamento

A verificação da eficiência de encapsulamento (EE) foi realizada indiretamente, pela diferença entre a concentração de proteína da solução citrato-antígeno, antes do gotejamento na solução de quitosana, e a concentração de proteína presente no sobrenadante após a centrifugação. Desta forma, pode-se verificar a quantidade de proteína que foi encapsulada (Koppolu et al. 2014; Lee et al. 2016).

A porcentagem de eficiência é calculada a partir da equação:

$$EE (\%) = \frac{(\text{conc. proteína inicial}) - (\text{conc. proteína no sobrenadante})}{(\text{conc. proteína inicial})} \times 100$$

3.5.4 Caracterização das partículas

3.5.4.1 Tamanho de partículas

Para determinação do tamanho das partículas presentes na suspensão, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (*laser light scattering* dinâmico - DLS). Esta técnica foi realizada no laboratório de Biomateriais (LABIOMAT), localizado no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

As amostras das formulações do IFA da vacina meningocócica C conjugada em diferentes concentrações de solução de quitosana foram diluídas em água destilada, com quantidade suficiente para obtenção de absorvância menor que 0,2 mAU. Em seguida, as amostras foram analisadas pelo analisador de partículas por difração a laser SHIMADZU (0,03-1000 μm). A leitura foi realizada em um único ensaio e os dados de desvio padrão foram fornecidos pelo equipamento.

3.5.4.2 Potencial zeta

O potencial zeta da suspensão foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ).

A aplicação mais comum para o potencial zeta está relacionada a estabilidade eletrostática das suspensões. Para análise, os *pellets* das formulações após centrifugação foram ressuspensos em solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 mM, preparada em água Milli-Q. As amostras foram transferidas para a cubeta do analisador de potencial zeta- Zeta Plus. Foram realizadas 10 leituras com cada amostra (Frases et al. 2008).

3.5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para avaliação da morfologia da suspensão das partículas foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura. Esta técnica foi realizada no laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia (LABNANO), localizado no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

As amostras foram gotejadas, juntamente com álcool isopropílico, em fitas de carbono. Em seguida, foram recobertas com filme de ouro, 40 mA por 30 s e analisadas por MEV, utilizando microscópio de duplo feixe Lyra. As imagens foram obtidas por detector de elétrons secundários.

3.5.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é uma técnica muito utilizada para determinação da estrutura e conformação de compostos orgânicos, principalmente de polissacarídeos bacterianos.

Amostras do IFA, da formulação do antígeno em quitosana e do branco foram analisadas por ¹H-RMN 1-D no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Far-Manguinhos (FIOCRUZ), no espectrômetro Bruker Avance, 400 MHz (Bruker BioSpin, Germany). As amostras foram liofilizadas para a obtenção de massa seca. Em seguida, foram solubilizadas em água deuterada (D₂O) (D, 99,9% + 0,01% DMSO-D₆ (p/p) + 0,01% DSS-D₆, Cambridge Isotope Laboratories Inc.), para a obtenção de

soluções contendo 10 mg mL^{-1} (p/v). As análises por RMN foram realizadas à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Com o mesmo espectrômetro e as mesmas condições da amostra, foi realizada a técnica de DOSY. O teste foi efetuado utilizando uma sonda de 5 mm, janela espectral de 4801,537 Hz, tempo de aquisição de 1,706 segundos e 1 Hz de linha de base.

3.5.6 Reação de *Dot blot*

Para verificar a preservação da identidade do antígeno após formulado em quitosana foi realizada a técnica de *Dot blot*. Para esta técnica foi necessário realizar a liberação do polissacarídeo conjugado das partículas formadas, utilizando uma adaptação da metodologia descrita no trabalho de Sant`Ana (2013). Na liberação do antígeno encapsulado, a suspensão contendo as partículas foi centrifugada, o sobrenadante descartado e as partículas contidas no *pellet* foram ressuspensas em tampão PBS pH 7,4 (NaCl 1,37 M; KCl 27 Mm Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 20 mM). Em seguida a suspensão foi mantida a 37°C em termobloco por 4 horas, com leve agitação manual a cada 30 minutos. Após este período a amostra foi submetida a 10 segundos de sonicação. As amostras obtidas foram então encaminhadas para o teste de *Dot blot*.

As formulações do antígeno encapsulado com a solução de quitosana e do branco foram diluídas em água ultrapura para uma concentração de 800, 400, 200 e 100 ng/mL, utilizando como base a metodologia descrita no trabalho de Argondizzo (2013). Um volume de 6 μL de cada amostra foi gotejado em membranas de nitrocelulose, cortadas em tiras de 1 por 5 cm. Para confirmação dos resultados foi analisado paralelamente o IFA da vacina meningocócica C conjugada, como controle positivo. Todos os testes foram realizados no mesmo dia, nas mesmas condições.

Foram utilizados soro de camundongos imunizados com a vacina meningocócica C conjugada, nas diluições de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. Além disso, as amostras também foram testadas com soro pré-imune de camundongos nas mesmas diluições, como controle negativo. O soro foi obtido a partir de um esquema de imunização de 3 doses, com intervalos de 15 dias entre as mesmas. As coletas de soro foram realizadas antes de cada imunização, sendo o soro pré-imune coletado antes da primeira imunização.

As membranas foram bloqueadas com 2 mL da solução contendo 5% de leite desnatado diluído em PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,05% por um período de 2

horas, sob agitação branda a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução de PBS pH 7,4 + Tween 20 0,05%. Este procedimento foi realizado por três vezes com duração de 5 minutos cada lavagem.

Após a lavagem foram adicionados às membranas 2 mL do anticorpo primário diluído previamente com PBS pH 7,4 + Tween 20 0,05%, contendo 0,25% de BSA. As tiras foram então mantidas por um período de 2 horas, sob agitação branda à temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram lavadas com PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,05% (3 vezes de 5 minutos cada).

Ao término das lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo (célula inteira), fornecido pela empresa Sigma Aldrich (A3688). Este anticorpo foi diluído na proporção de 1: 30.000 em PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,05%, contendo 0,25% de BSA. As amostras foram mantidas por 1 hora, sob agitação branda à temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas mais três lavagens com PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,05% (5 minutos cada).

Por último, foram adicionados 2 mL da solução reveladora *Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase*, fornecido pela Promega, afim de promover a revelação das membranas.

3.5.7 Imunização

Para imunização foram utilizados 25 camundongos Suíços do sexo feminino, com peso entre 17 e 23 g, proveniente do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB)/Fiocruz. As imunizações e coletas foram realizadas no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN), localizado em Bio-Manguinhos/ Fiocruz. Este experimento está de acordo com o registro CEUA LW65/14.

Os animais foram divididos em três grupos:

- **Grupo 1** - 10 camundongos imunizados com o IFA da vacina meningocócica C conjugada formulada com quitosana 1,0% (2 caixas com 5 animais).
- **Grupo 2** - 10 camundongos imunizados somente com o IFA da vacina meningocócica C conjugada (2 caixas com 5 animais).
- **Grupo 3** - 5 camundongos imunizados com a formulação branco, contendo somente a solução de quitosana 1,0% (1 caixa com 5 animais).

Os três grupos receberam as duas primeiras imunizações por via intranasal e a terceira via intramuscular na pata traseira, com intervalo de 15 dias entre as imunizações (Neutra & Kozlowski 2006; Yoshida 2012).

Nas imunizações por via intranasal foram administrados 10 µL da suspensão (contendo 1 µg do antígeno), sendo 5 µL em cada narina, com o auxílio de uma micropipeta. Na imunização intramuscular foram aplicados 200 µL da suspensão (contendo 1 µg do antígeno). A taxa de encapsulamento foi levada em consideração no cálculo para diluição da suspensão das partículas, afim de obter a quantidade adequada de antígeno aplicada em cada animal.

Antes das imunizações intranasal, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina (7 mg/Kg) e cloridrato de ketamina (70 mg/Kg).

3.5.8 Ensaio desafio

No dia 51, todos os grupos de animais foram submetidos ao ensaio de desafio com *N. meningitidis* sorogrupo C, utilizando modelo de infecção hiperferrêmico (Sifontes et al. 1997; Jessouroun et al. 2004).

Os animais foram inoculados via intraperitoneal com 9 mg de ferro-dextran (Sigma- D8517) em 0,5 mL de suspensão, anteriormente ao desafio com 0,5 mL da suspensão bacteriana (6×10^6 UFC/mL), também por via intraperitoneal. Esta suspensão correspondeu a 3 vezes a Dose Letal 50 (DL 50), dose da suspensão bacteriana capaz de induzir 50% de morte dos animais. Os animais foram acompanhados por 72 h para avaliação da sobrevivência.

3.5.9 Coleta das amostras

As coletas de sangue, para obtenção do soro e de saliva, ocorreram antes de cada imunização (dias 0, 14, 29), 20 dias após a 3ª imunização (dia 50) e 7 e 14 dias após o ensaio de desafio (dias 58 e 65), conforme apresentado na Tabela 3.1. As amostras foram coletadas em *pool* por caixa de animais (grupos de 5 animais) de cada grupo.

Tabela 3.1: Esquema de Imunização e coleta.

Dia	0	1	14	15	29	30	50	51	58	65
Imunização		x		x		x				
Coleta (sangue e saliva)	x		x		x		X		x	x
Desafio								x		

3.5.9.1 Soro

A obtenção do soro ocorreu a partir da coleta de sangue (sangria) do plexo retro orbital. Antes da sangria, os animais foram submetidos a anestesia local (ocular) com uma gota de colírio contendo cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%.

Os tubos com gel separador contendo as amostras de sangue foram então centrifugados a 1000 g (3000 rpm) por 10 minutos, utilizando a centrífuga Centra CL2. O soro obtido foi segregado em alíquotas de 200 µL e armazenado em freezer -20°C até o momento do uso.

3.5.9.2 Saliva

Para coleta de saliva foi necessário induzir o aumento do fluido a partir da injeção intraperitoneal com solução de pilocarpina. Para o preparo desta solução utilizou-se a proporção de 0,1 mg da solução oftalmológica de cloridrato de pilocarpina 1% (Allergan®), obtida em farmácia, para 100 µL de PBS pH 7,4. A quantidade de solução aplicada variou em relação ao peso dos animais, seguindo uma proporção de 5 µL/g. Esta proporção foi obtida a partir de uma avaliação prévia da dosagem de pilocarpina em relação ao aumento da produção de saliva nos camundongos.

Após 2-7 minutos da aplicação de pilocarpina, foi realizada a coleta da saliva com o auxílio de uma seringa de 1,0 mL (sem agulha), em tubos de 2 mL. Posteriormente, foi adicionado ao volume de amostra obtido 0,1% do inibidor de protease PMSF- *Phenylmethylsulfonyl fluoride*. Após homogeneização, as amostras foram separadas em alíquotas de aproximadamente 200 µL e armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

3.5.10 Determinação de título de anticorpos (ELISA- *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

Para a detecção de títulos de anticorpos IgG, contra o polissacarídeo conjugado nos soros de todos os grupos de animais, foi utilizado o teste imunoenzimático (ELISA) seguindo o modelo descrito por Gheesling et al. 1994.

Placas Immulux HB foram sensibilizadas para fixação do polissacarídeo complexado com 100 µL/ poço de solução de sensibilização e incubadas à 4 °C em câmara úmida. Esta solução foi preparada a partir do gotejamento da solução de Polissacarídeo C (10 µg/mL em PBS 0,01M) à uma solução de albumina metilada humana (10 µg/mL em PBS 0,01M), sob leve agitação. Após adição, a mistura permaneceu sob leve agitação por 30 minutos.

No dia posterior, as placas foram lavadas por seis vezes com 200 µL/ poço com tampão de lavagem (Tampão Tris em solução salina; TBS com Tween 20 0,05%) utilizando a lavadora de placas automática Skan Washer 300. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 µL/ poço com solução de bloqueio (TBS contendo 5% de soro fetal bovino) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida.

As amostras de soro coletadas nos dias 0 e 14 foram diluídas inicialmente na proporção de 1:50 e dos dias 29, 50, 58 e 65 na proporção de 1:1000. Além disso foi utilizado o soro padrão na diluição de 1:8000. Após diluição, estas amostras foram adicionadas à placa onde realizou-se diluições seriadas com fator 2. As placas foram incubadas por uma noite à 4 °C em câmara úmida.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas seis vezes com o tampão de lavagem e incubadas com 100 µL/ poço do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (diluído 1:2500; anti-IgG A3688) por 2 horas. Após este período foi realizado mais um ciclo de lavagem e adicionados 100 µL/ poço com solução de substrato com fosfatase alcalina (1 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz.

A absorbância foi lida a 405 nm no leitor de placas Tecan Infinite, utilizando o software Magelan. Os títulos de anticorpos das amostras foram calculados a partir da unidade atribuída ao soro padrão (746,14 EU/mL), utilizado para obtenção da curva padrão. O cálculo foi realizado pelo programa Softmax Pro.

Para a detecção de títulos de anticorpos IgA nas amostras de saliva dos animais também foi utilizada a metodologia descrita acima, porém com o anticorpo anti-IgGAM (Sigma A0162) de camundongo conjugado à fosfatase alcalina na diluição de 1:2000. Além disso, as amostras para todos os tempos de coleta foram diluídas na proporção de 1:10.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulamento (EE%)

A preparação das partículas formadas pelo antígeno com quitosana, em variadas concentrações, resultou em diferentes taxas de eficiência de encapsulamento.

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 demonstram as eficiências obtidas nos experimentos utilizando solução de quitosana nas concentrações de 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v). Dentre as concentrações testadas, a solução de quitosana com 1,0% (p/v) de concentração promoveu uma melhor taxa: EE%= 82,04.

Tabela 4.1: Taxas de eficiência de encapsulamento (EE%) utilizando as concentrações de quitosana 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v) na formulação. Ensaios realizados em duplicata.

Concentração de quitosana			
na formulação (%)	EE (%)	Média EE (%)	Desvio Padrão
0,25	61,99	63,22	1,74
	64,45		
0,50	71,19	71,88	0,98
	72,58		
0,75	74,20	74,67	0,66
	75,14		
1,0	82,20	82,04	0,23
	81,88		

Além disso, pode-se verificar um aumento na taxa de eficiência de encapsulamento proporcionalmente ao aumento da concentração de quitosana na solução (Figura 4.1). Desta forma, podemos identificar a influência da concentração do polímero na eficiência do encapsulamento do antígeno.

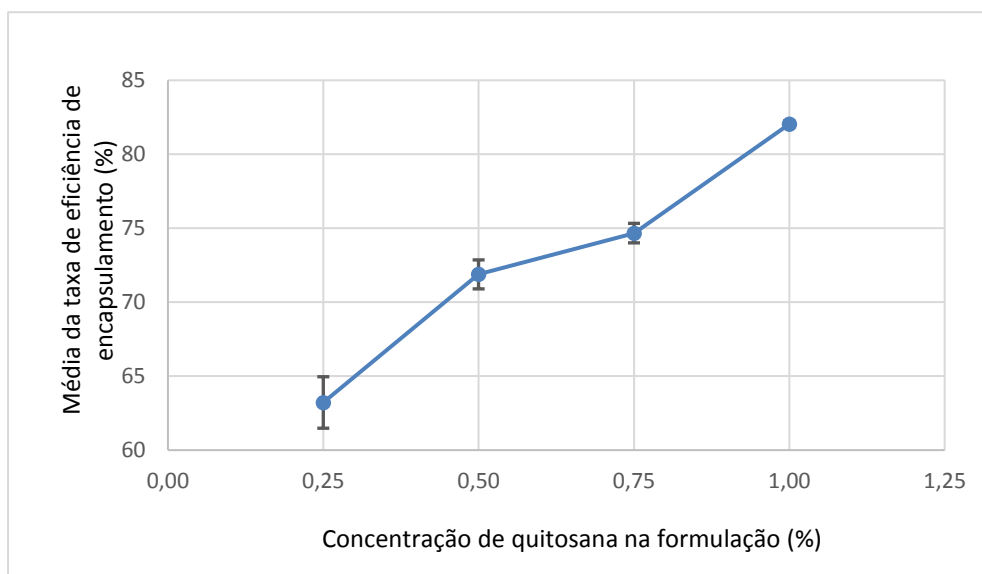


Figura 4.1: Variação da taxa de eficiência de encapsulamento em diferentes concentrações de quitosana na formulação.

4.2 Caracterização das partículas

4.2.1 Tamanho de partículas

As formulações com quitosana resultaram na formação de partículas com diferentes tamanhos. Na Tabela 4.2 estão demonstrados os tamanhos médio das partículas obtidos nas formulações utilizando o antígeno com as variadas concentrações de quitosana. As formulações (antígeno - quitosana) apresentaram tamanho médio das partículas de 0,475 μm para a concentração de quitosana 0,25% (p/v), menor em relação às demais formulações que apresentaram tamanhos médios de 0,694 μm , 0,767 μm e 0,734 μm , para as concentrações de 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v), respectivamente.

Tabela 4.2: Tamanho médio das partículas nas formulações da vacina meningocócica C conjugada em diferentes concentrações de quitosana. Leitura realizada em um único ensaio e os dados de desvio padrão foram fornecidos pelo equipamento.

Concentração de quitosana na formulação (%)	Tamanho médio das partículas (μm)	Desvio Padrão
0,25	0,475	0,159
0,50	0,694	0,257
0,75	0,767	0,306
1,00	0,734	0,371

Na Figura 4.2 podem-se verificar os gráficos com as curvas de distribuição das partículas nas formulações em diferentes concentrações de quitosana. Nos gráficos demonstrados na figura, o eixo das abscissas representa o diâmetro referente às partículas em micrometros (escala logarítmica) e nas ordenadas temos no eixo principal a quantidade de partículas e no secundário a quantidade percentual das partículas.

Todas as amostras demonstraram uma curva sigmoide de distribuição acumulada. Tamanhos de partículas menores que 1 μm foram verificados em 94% das distribuições para as formulações com quitosana 0,25% e 70% nas formulações com quitosana 0,50%, 0,75% e 1,0%. Além disso, observou-se a partir dos histogramas uma diminuição na uniformidade dos tamanhos das partículas conforme o aumento da concentração na formulação.

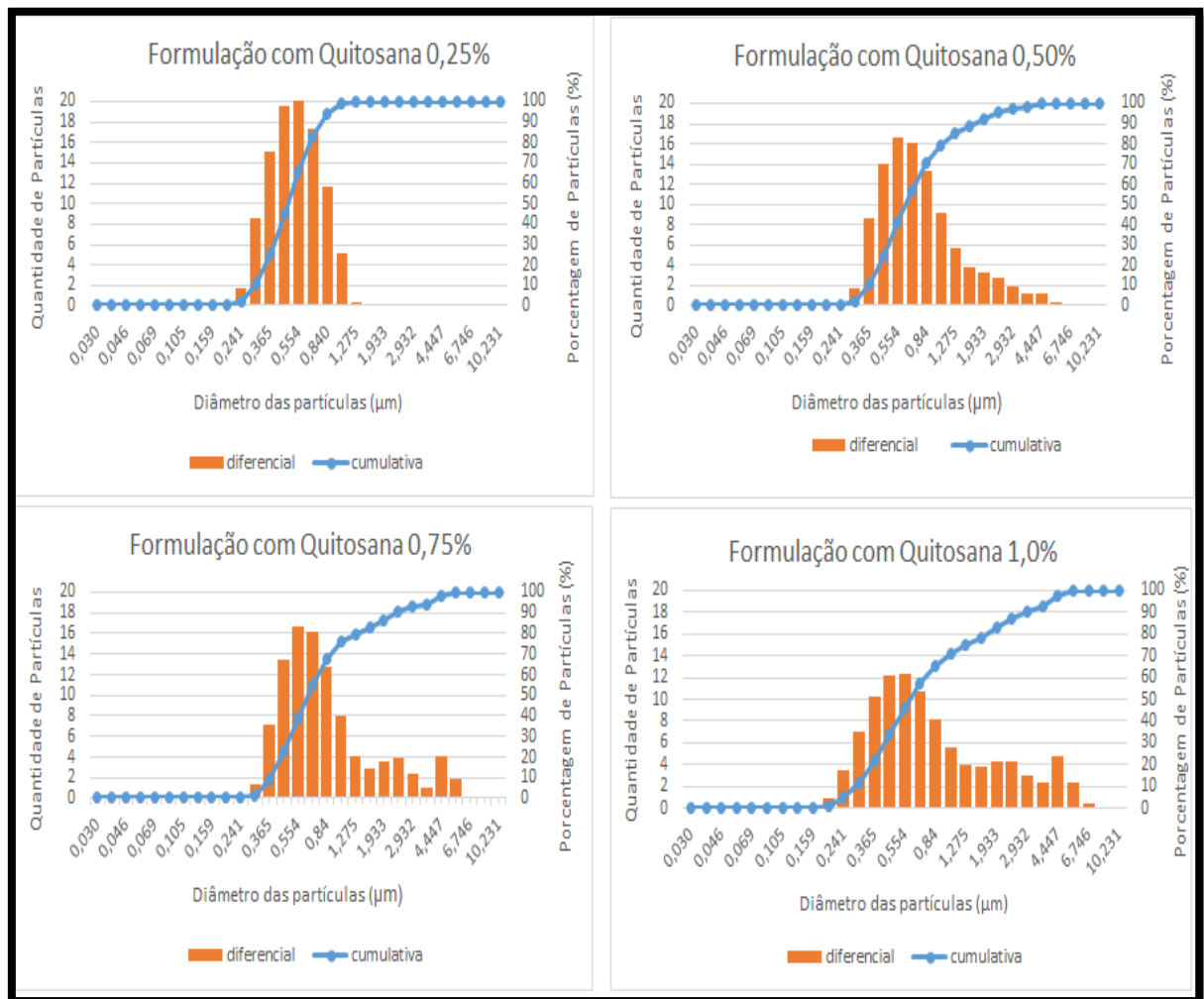


Figura 4.2: Distribuição do tamanho médio das partículas nas formulações com as concentrações de quitosana: 0,25 %, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v), obtidas a partir do analisador de partículas por difração a laser- SHIMADZU.

4.2.2 Potencial zeta

A Tabela 4.3 demonstra as medidas de potencial zeta das partículas presentes nas formulações com diferentes concentrações de quitosana. A formulação com quitosana 0,25% (p/v) apresentou uma boa estabilidade eletrostática da partícula em suspensão, com potencial zeta médio de + 40,05 mV. As formulações com quitosana 0,50%, 0,75% e 1,0% apresentaram menor estabilidade em relação a 0,25%, com potencial zeta médio de + 24,79 mV, + 27,16 mV, + 25,06 mV, respectivamente.

Tabela 4.3: Medidas de potencial zeta das formulações com quitosana 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v). Média de dez leituras para cada amostra.

Concentração de quitosana na formulação (%)	Média do Potencial Zeta (mV)	Desvio Padrão
0,25	+ 40,05	4,91
0,50	+ 24,79	4,49
0,75	+ 27,16	4,07
1,00	+ 25,06	9,40

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Não foi possível obter a morfologia das suspensões contendo as partículas. Observou-se somente os cristais do sal utilizado para ressuspensão e ao fundo o polímero quitosana (Figura 4.3).

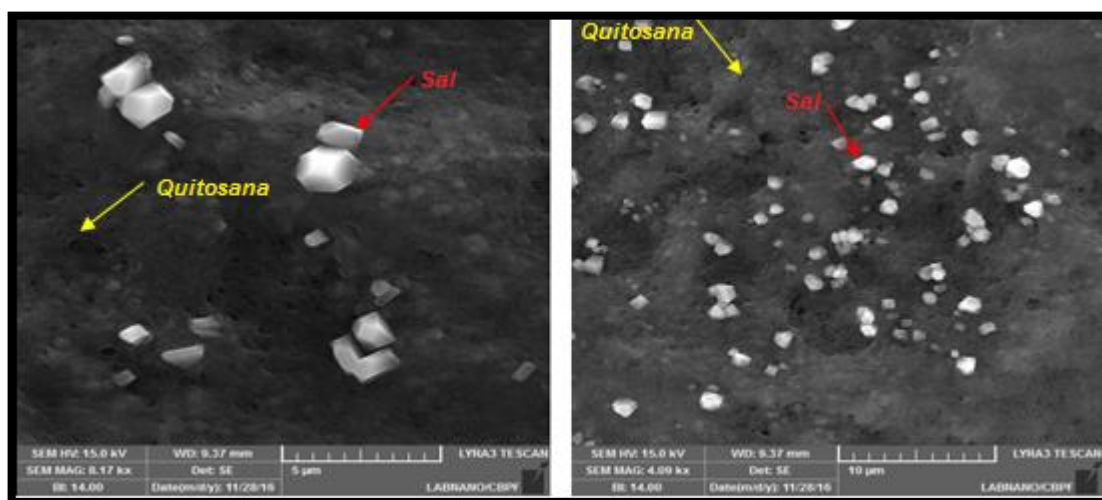


Figura 4.3: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das suspensões contendo as partículas do antígeno com quitosana.

4.3 Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear foi realizada para verificação da identidade do IFA da vacina meningocócica C conjugada formulada em quitosana. Para realização desta técnica, assim como para os testes de *Dot blot* e ensaio animal, selecionou-se a formulação com concentração de quitosana 1,0% (p/v), a qual se obteve maior taxa de eficiência de encapsulamento.

Na Figura 4.4 estão demonstrados os espectros do IFA da vacina meningocócica C conjugada (A), da solução de quitosana 1,0% (p/v) (B) e do antígeno encapsulado com quitosana (C). Além disso, está presente o espectro de DOSY do antígeno em quitosana (D).

O espectro A apresenta os hidrogênios presentes no IFA da vacina Meningocócica C conjugada, com seus respectivos deslocamentos químicos. Pode-se observar os deslocamentos referentes aos hidrogênios O- acetilados e N- acetilados (H-7 e H-8) em torno de 5,0 a 5,2 ppm. A região relativa ao anel piranosídico do polissacarídeo conjugado na região compreendida entre 3,3 a 4,3 ppm, os hidrogênios axial e equatorial pertencentes aos resíduos de ácido siálico, com os deslocamentos na faixa relativa de 2,4 a 2,8 e 1,5 a 1,8 ppm, e a região entre 0,4 a 1 ppm, referente aos grupos alifáticos da proteína do toxóide tetânico presente no IFA.

No espectro B são verificados os deslocamentos químicos dos hidrogênios da quitosana, utilizada na preparação. Dentre os deslocamentos, destacam-se os sinais do hidrogênio pertencente ao carbono anomérico, na região de 5,3 ppm.

Já no espectro C estão presentes os deslocamentos referentes ao antígeno encapsulado com quitosana, onde são observados sinais relativos ao hidrogênio dos carbonos anoméricos do IFA e da solução de quitosana utilizada no processo de preparação. Contudo, os demais sinais relativos ao IFA não foram observados com precisão, devido à interferência dos sinais do polímero e do citrato de sódio, utilizados no preparo da formulação.

Devido a esta interferência, foi realizado um espectro de DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) 2D do IFA formulado. Esta análise foi realizada com a finalidade de observar as diferenças hidrodinâmicas entre os compostos utilizados na formulação, a partir das diferenças no raio hidrodinâmico efetivo. Este tipo de relação pode ser muito útil para espécies com tamanhos moleculares diferentes, contudo não é aplicada à mistura de isômeros, cujas espécies possuem tamanho e estrutura semelhante. Todavia, não se pode observar um bom coeficiente de difusão. Foi

verificado somente alguns deslocamentos relativos à quitosana, ao IFA e ao citrato de sódio, evidenciado na região de 2,6 a 2,9 ppm no espectro D da Figura 4.4.

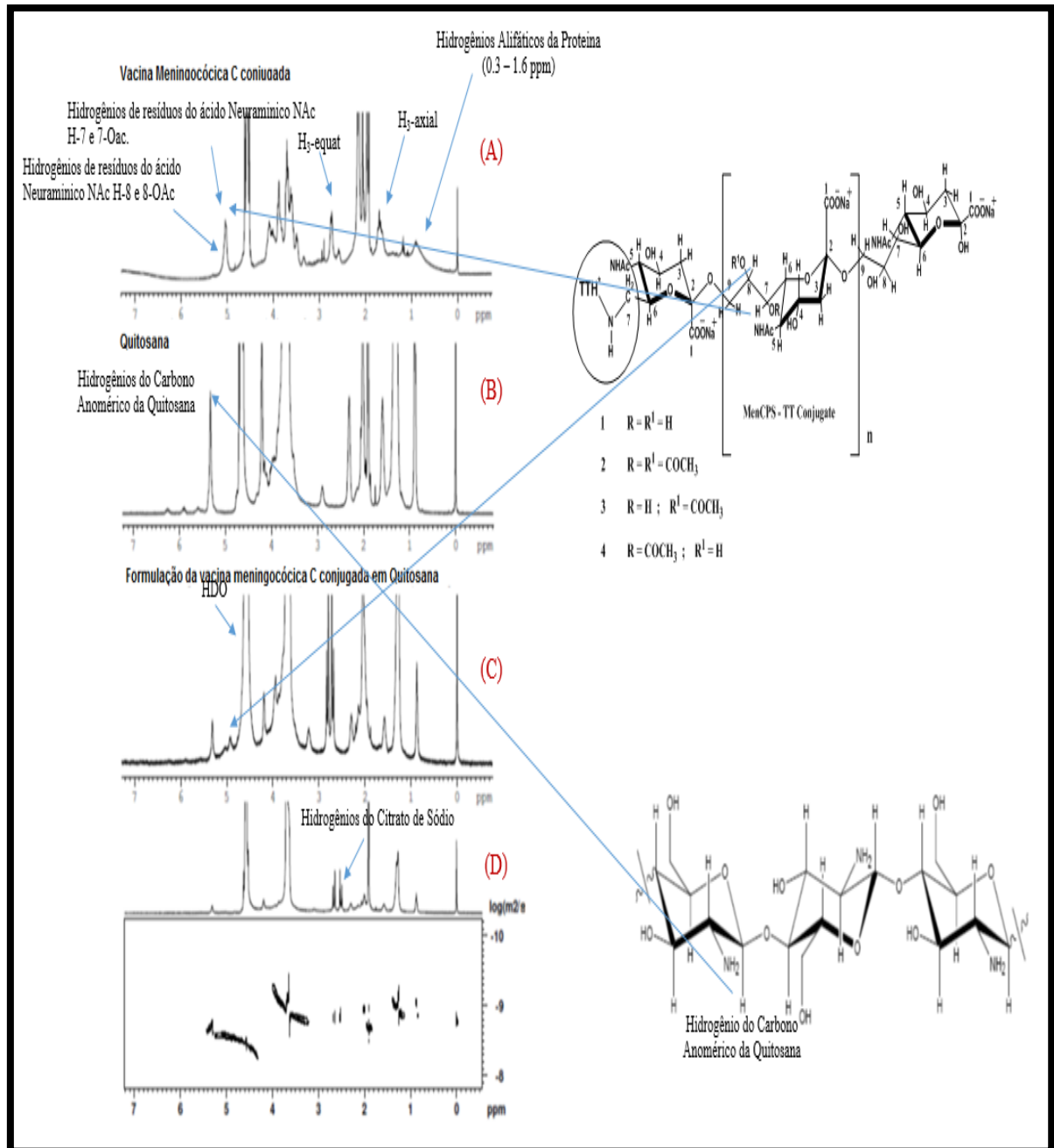


Figura 4.4: Espectros obtidos na análise de RMN das amostras do IFA da vacina meningocócica C conjugada (A), da solução de quitosana 1,0% (B), do antígeno encapsulado com quitosana (C) e do espectro de DOSY do antígeno encapsulado (D).

4.4 Reação de *Dot blot*

Para avaliarmos a identidade do antígeno após ser formulado em quitosana foi utilizada a metodologia de *Dot blot*. Na Figura 4.5A pode-se verificar que todas as concentrações utilizadas do antígeno em quitosana 1,0% reagiram a todas diluições dos anticorpos testadas, assim como o controle positivo. O branco também apresentou reação com o anticorpo utilizado nas mesmas condições, porém com menor intensidade em relação ao antígeno encapsulado.

Na avaliação do controle negativo, utilizando soro de camundongos não imunizados (Figura 4.5B), foram identificadas reações de baixa intensidade nas amostras do IFA formulado em quitosana e do branco. Já o controle, constituído do IFA sem a presença de quitosana, não houve reação com o soro pré-imune.

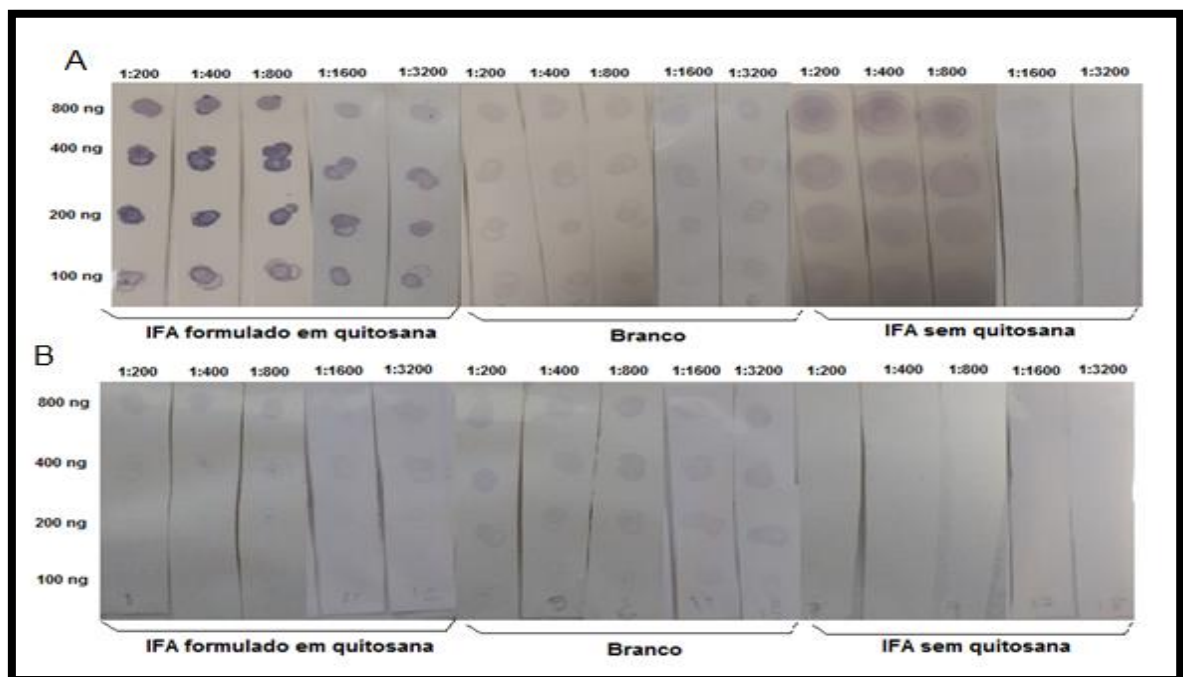


Figura 4.5: Avaliação da preservação da antigenicidade e identidade a partir da técnica de *Dot blot*, utilizando como revelador fosfatase alcalina. A) Foram aplicadas as amostras do IFA formulado em quitosana 1,0%, do branco, contendo a formulação sem o antígeno, e do IFA sem a presença de quitosana (controle positivo), nas concentrações de 800, 400, 200 e 100 ng/mL em membranas de nitrocelulose. Para todas as amostras foram utilizados anticorpos primários (soro de camundongos imunizados) nas diluições de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. B) Controle negativo nas mesmas concentrações das amostras. O soro de camundongo não imunizado, denominado pré-imune, foi utilizado nas mesmas diluições do anticorpo de camundongos imunizados.

4.5 Ensaio desafio

A avaliação preliminar da proteção conferida pelo antígeno formulado em quitosana foi verificada durante 72 horas após inoculação de ferro-dextran e desafio com suspensão da bactéria *N. meningitidis* sorogrupo C.

O IFA da vacina meningocócica C formulada com quitosana 1,0% (p/v) foi capaz de proteger 100% dos animais desafiados após 21 dias de imunização, assim como o grupo de animais imunizados somente com o IFA da vacina meningocócica C conjugada. Além disso, nenhum dos animais desses dois grupos apresentaram manifestações clínicas.

Entretanto, no grupo de animais inoculados com o branco, sem a presença do antígeno, dois animais morreram após o desafio com a bactéria. Os outros três animais, que sobreviveram ao desafio, apresentaram sintomas como: perda de peso, pelos eriçados, dorso arqueado e desidratação (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Avaliação da proteção de camundongos desafiados com suspensão bacteriana após 21 dias de imunização com 2 doses intranasal e 1 dose intramuscular, em intervalos de 15 dias. Avaliação durante 72 h após inoculação de Ferro- Dextran e desafio com *N. meningitidis* sorogrupo C.

Grupos	Total de animais desafiados	Número de animais mortos	Avaliação físico-clínica
1- IFA da vacina meningocócica C conjugada formulada com quitosana 1,0%	10	0	Os animais se mantiveram saudáveis.
2- IFA da Vacina meningocócica C conjugada	10	0	Os animais se mantiveram saudáveis.
3- Formulação em Branco (sem antígeno)	5	2	Os três animais sobreviventes apresentaram perda de peso, pelos eriçados, dorso arqueado e desidratação.

4.6 Teste de ELISA para quantificação de anticorpos

As amostras do soro de camundongos inoculados com o IFA da vacina meningocócica C conjugada formulada em quitosana (Grupo 1), somente com o IFA

da vacina (Grupo 2) e com a formulação branco (Grupo 3), foram analisadas pelo teste de ELISA.

Para todos os grupos, os títulos de anticorpos IgG no soro pré-imune (T0), nos dias 14 (T14) e 29 (T29) estavam abaixo do limite de detecção. Já nos dias 50 (20 dias após a terceira dose e pré-desafio), 58 e 65 (7 e 14 dias após o desafio, respectivamente), somente o grupo 1 induziu altos títulos de anticorpos IgG. Entretanto, verificou-se diferença entre as caixas de animais do mesmo grupo, nas concentrações de anticorpos (Figura 4.6).

Infelizmente, não foi possível detectar títulos de anticorpos IgA na saliva dos animais. Nenhuma das amostras analisadas reagiram ao conjugado utilizado.

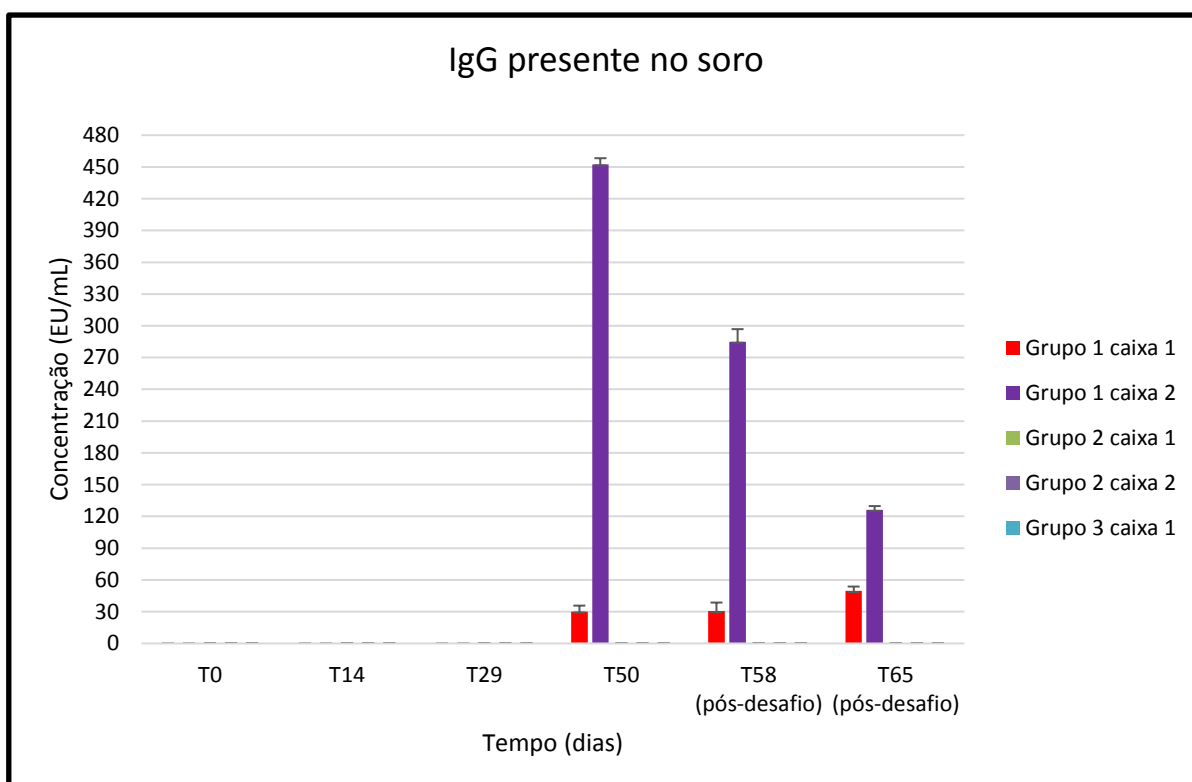


Figura 4.6: IgG total presente no soro de camundongos imunizados com 2 doses via intranasal e 1 dose intramuscular, em intervalo de 15 dias. Grupo 1: IFA da vacina meningocócica C conjugada formulada em quitosana; Grupo 2: IFA da vacina meningocócica conjugada; Grupo 3: Formulação em branco; Os valores correspondem à média geométrica de 2 leituras.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos da variação da concentração de quitosana na formação das partículas, empregando a metodologia de coacervação em meio ácido. A quitosana é um dos polímeros mais utilizados para formulações de vacinas de mucosa. Sua eficácia tem sido demonstrada em diversos trabalhos, como nas publicações de McNeela et al. (2000) e de Xu et al. (2015), contra difteria e *Streptococcus pneumoniae*, respectivamente. Este polímero, quando em soluções ácidas, permite a moldagem em diversas formas como géis, esferas e cápsulas (Yoshida 2012).

A metodologia de coacervação, utilizada para o preparo das formulações, é uma técnica trivial em relação às demais descritas e, factível de produção em escala industrial. Quitosana pode ser esterilizada a fim de garantir a inocuidade do insumo. Ji & Shi (2012) demonstraram bons resultados de esterilização térmica, utilizando autoclavação. Contudo, métodos convencionais, como calor úmido e radiação, devem ser estudados cuidadosamente e então otimizados, pois podem causar hidrólise da cadeia, redução da integridade da molécula e liberação de resíduos tóxicos (Crofton et al 2016).

A concentração de antígeno utilizada para o preparo das partículas foi empregada a fim de conseguirmos quantificar proteínas na formulação, pela metodologia de BCA, em relação à quantidade de proteínas existente na quitosana.

As formulações com o insumo farmacêutico ativo da vacina meningocócica C conjugada demonstraram altas taxas de eficiência de encapsulamento. Podemos inferir que a carga negativa do polissacarídeo conjugado influenciou na eficiência obtida. Isto se deve às interações eletrostáticas entre o conjugado, carregado negativamente, com a quitosana em solução ácida, carregada positivamente.

O parâmetro variável na preparação das partículas foi a concentração da quitosana em solução. A concentração máxima de quitosana foi escolhida devido à dificuldade de solubilidade do polímero em solução conforme o aumento da concentração do reagente.

Observou-se uma significativa influência da proporção de quitosana-antígeno na eficiência encontrada. Como demonstrado na Figura 4.1, a taxa de carregamento aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de quitosana e, a concentração de 1,0% demonstrou a melhor eficiência, com 82,04%. Podemos sugerir que o aumento da proporção de quitosana para o antígeno proporcionou um aumento das cargas positivas e conseqüentemente uma maior interação com o polissacarídeo conjugado.

A taxa de 82,04% obtida para formulação em quitosana 1,0% foi semelhante ao encontrado por Koppolu et al. (2014), no qual obteve-se 86% de eficiência para o encapsulamento da proteína albumina sérica bovina (BSA). Para o preparo destas partículas de BSA, também foi utilizado o sal de citrato de sódio como sal precipitante, porém em condições e proporções diferentes.

A determinação do tamanho médio da partícula formada é de grande importância, pois pode influenciar significativamente no sucesso da formulação da vacina de mucosa. Isto porque a captação destas por células apresentadoras de antígenos está diretamente relacionada ao seu tamanho. Partículas com tamanho próximo aos de patógenos, como vírus (5-300 nm) e bactérias (1-5 μm), podem simular um processo infeccioso e produzir uma maior interação com o sistema imunológico (He et al. 2010; Cordeiro et al. 2015).

Todas as concentrações de quitosana testadas no presente trabalho resultaram em formulações com tamanhos médios das partículas menores que 1 μm (Tabela 4.2). Estes dados encontrados estão de acordo com estudos realizados previamente por Koppolu & Zaharoff (2013), que descreve 300 nm a 1 μm como uma faixa de melhor captura das partículas pelas células dendríticas e macrófagos.

A concentração de quitosana 0,25% (p/v) demonstrou um menor tamanho médio da partícula em comparação com as demais concentrações (0,5%, 0,75% e 1,0% (p/v)). Segundo Schaffazick et al. (2003), diversos fatores podem influenciar neste atributo, como a metodologia de preparação, as características e a concentração das substâncias utilizadas.

Outro parâmetro observado foi o potencial zeta das suspensões. As suspensões das partículas possuem carga superficial com uma dupla camada adsorvida, denominada dupla camada elétrica, que é composta de íons com carga oposta à das partículas. Esta camada fornece à partícula uma força motriz tangencial, onde há compartilhamento de íons. Este potencial elétrico é denominado potencial zeta, que reflete a diferença potencial entre a dupla camada elétrica das partículas em

movimento sob um campo elétrico e a camada de dispersante presente ao seu redor em um plano de deslizamento (Lin et al 2014; Bhattacharjee 2016).

Este teste foi verificado a fim de avaliar a estabilidade eletrostática das partículas em suspensão. De acordo com Patel & Agrawal (2011), um valor mínimo de ± 30 mV é requerido para uma alta estabilidade eletrostática da suspensão. Segundo Bhattacharjee (2016), guias para classificação das dispersões de nanopartículas informam valores de potencial zeta de $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV, $\pm 20-30$ mV e ± 30 mV como altamente instável, relativamente estável, moderadamente estável e altamente estável, respectivamente; sendo definições comum em literaturas de liberação de antígenos (*drug delivery system*). Entretanto, somente o valor de potencial zeta não é uma avaliação completa da estabilidade da amostra, fornecendo somente informação de forças eletrostáticas, mas nenhum indicativo das forças de Van Der Waals.

O valor de potencial zeta obtido na formulação com quitosana 0,25% (p/v) de concentração foi de $+40,05 \pm 4,91$ mV, indicando uma alta estabilidade eletrostática nesta suspensão. Já as formulações com quitosana 0,50%, 0,75% e 1,0% (p/v) apresentaram uma estabilidade moderada sendo: $+24,79 \pm 4,49$ mV; $+27,16 \pm 4,07$ mV e; $+25,06 \pm 9,40$ mV, respectivamente. Esses valores demonstram a tendência de repulsão entre as partículas, impossibilitando a agregação das mesmas.

A concentração de quitosana 0,25% (p/v) demonstrou menor tamanho das partículas e maior estabilidade eletrostática nas formulações. Contudo, apesar dos melhores resultados na caracterização das partículas, esta concentração apresentou uma baixa eficiência de encapsulamento em relação às demais concentrações. Desta forma, para atingir a dose necessária, seria preciso o uso de uma maior quantidade de antígeno para formulação. Visto isto, para os testes de identidade (*Dot blot* e RMN) e para o ensaio animal foi escolhida a formulação do antígeno encapsulado com quitosana 1,0% (p/v), a qual obteve-se maior taxa de eficiência de encapsulamento: 82,04% e parâmetros de caracterização satisfatórios.

Para verificar a morfologia da suspensão contendo as partículas, tentamos observar as amostras a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura. Contudo, não foi possível a visualização das partículas formadas. O microscópio disponível para esta análise não possuía resolução para maior ampliação da imagem, ocasionando a perda de foco. Desta forma, somente foi verificado o sal utilizado na ressuspensão das partículas e a estrutura do polímero quitosana, que pode ter sido influenciada pelo processo de secagem da amostra (Figura 4.3).

Além das caracterizações das partículas do IFA da vacina meningocócica C conjugada em quitosana, foram realizados testes para preservação da identidade do antígeno após a formulação. Técnicas de identificação do antígeno encapsulado não são muito verificadas em publicações de nano e micropartículas utilizando quitosana. Devido às propriedades físico-químicas do polímero, não foi possível realizar o teste de quantificação de açúcar. Desta forma, realizamos as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de *Dot blot*.

Na comparação dos espectros de RMN das amostras de polissacarídeo conjugado formulado com quitosana, do branco e do conjugado não formulado, não se pode verificar completamente a integridade do antígeno (Figura 4.4). No espectro referente ao conjugado formulado, somente pôde ser observado alguns sinais dos hidrogênios anoméricos do conjugado sem formular, utilizado como referência. Os demais deslocamentos não foram identificados devido à interferência dos produtos utilizados na formulação: citrato de sódio e principalmente a quitosana.

Utilizou-se a técnica de DOSY 2D na tentativa de verificar na amostra formulada em quitosana os deslocamentos relativos ao conjugado. Esta técnica tem demonstrado uma maior resolução em relação ao 1-H RMN 1D. Além disso, este método é capaz de analisar misturas mais complexas, com tamanhos muito semelhantes, mas que não possuem espectros de RMN com boa resolução (Balayssac et al. 2009). Contudo, mesmo com a obtenção de um espectro de DOSY 2D, não foi possível observar todos os deslocamentos (Espectro D; Figura 4.4).

Na técnica de *Dot blot* verificamos que o conjugado formulado em quitosana apresentou reatividade em todas as diluições testadas de soro de camundongos imunizados com a vacina meningocócica C conjugada, mesmo em altas diluições. Contudo, o branco, na qual o polissacarídeo conjugado não está presente, também reagiu ao anticorpo testado, apesar de menor intensidade em relação à amostra formulada e ao controle positivo (Figura 4.5A).

A interferência da quitosana na metodologia de *Dot blot* pôde ser comprovada nos testes utilizando o soro pré-imune como controle negativo (Figura 4.5B). Neste teste, tanto o IFA formulado e o branco, apesar de menor intensidade, apresentaram reação com o soro pré- imune. Já o IFA sem formular (controle) não interagiu, demonstrando a influência da quitosana no teste. Desta forma, não foi possível verificar a preservação da identidade do antígeno.

Segundo Redigueri et al (2016), o grau de pureza e de desacetilação interferem no comportamento da quitosana em solução. Sugere-se que para próximos estudos

seja utilizado o reagente mais puro ou com suas propriedades modificadas, a fim de evitar a interferência do polímero nos testes e aumentar a eficiência de encapsulamento.

Para verificar a eficiência da formulação com quitosana e a inoculação intranasal, foi realizado um ensaio animal preliminar com desafio. O esquema de imunização baseou-se em duas doses via intranasal e uma dose via intramuscular em intervalos de 15 dias. Mesmo a proposta sendo via intranasal, utilizamos a última dose intramuscular a fim de potencializar a resposta imunológica sistêmica. De acordo com Neutra & Kozlowski (2006), a estratégia de imunização de mucosa se torna mais efetiva com combinações que envolvam tanto a entrega de antígeno pela mucosa quanto via sistêmica.

Devido ao baixo número de animais disponíveis para o ensaio, não foi possível verificar outros esquemas de imunização. Entretanto, devem ser realizados mais estudos com um número maior de animais, para comparação da resposta imunológica entre grupos administrados somente com doses via intranasal e os administrados com doses via intramuscular, verificando o esquema de imunização mais eficiente utilizando formulações com quitosana.

Antes do ensaio desafio, inoculamos uma fonte exógena de ferro (ferro-dextran) para obtenção da bacteremia nos animais. Em camundongos, *N. meningitidis* não é capaz de induzir doença meningocócica. Em humanos, para colonizar e provocar doença a bactéria necessita competir por ferro com proteínas transportadoras de ferro e assim ganhar a corrente sanguínea, o que não acontece nos camundongos. Segundo Sifontes et al. 1997 e Jessouroun et al. 2004, camundongos inoculados com ferro antes da suspensão bacteriana podem induzir a multiplicação da bactéria e ocasionar a morte por choque endotóxico, denominando como modelo hiperferrêmico de infecção.

A avaliação da proteção conferida foi realizada 72h após o ensaio desafio. Todos os animais imunizados com o IFA da vacina conjugada formulada em quitosana e os imunizados somente com o IFA apresentaram 100% de proteção. Em contraste, dos animais inoculados com a formulação branco, 2 vieram a óbito e os 3 sobreviventes ficaram doentes. Assim, podemos verificar que a formulação do IFA em quitosana demonstrou uma eficiente proteção, semelhante ao IFA não formulado.

Na avaliação imunoenzimática das amostras de soro dos animais, percebeu-se o aumento de títulos de IgG somente para o grupo imunizado com o IFA formulado em quitosana. Esses títulos só apareceram nas coletas 20 dias após a terceira

imunização (pré-desafio) e, 7 e 14 dias após o ensaio desafio. Além disso, foi observada diferença nas concentrações de anticorpos IgG entre as caixas de animais do mesmo grupo. Essa desconformidade pode ser explicada pela variação da resposta imunológica entre os animais, haja visto que as amostras foram coletadas em *pool* por caixas contendo 5 animais. Apesar de preliminar, este resultado demonstra a eficiência do uso da quitosana para modulação de uma resposta imunológica.

A via intranasal também possuiu um papel importante na proteção dos animais, pois mesmo não tendo sido detectados títulos de IgG, os animais imunizados somente com o IFA da vacina meningocócica C conjugada permaneceram vivos e saudáveis após o desafio. Este episódio pode ter ocorrido devido a atuação de anticorpos IgA ou pela resposta inata destes animais. Além disso, pode-se relacionar a atuação de anticorpos IgM, que possuem atividade bactericida e podem promover lise bacteriana. Infelizmente, não foi possível detectar a presença de anticorpos IgA nas amostras de saliva. Isto pode ser devido à degradação dos anticorpos na amostra, pelo não acondicionamento em gelo seco durante o período de coleta e transporte até o laboratório, ou pelo anticorpo utilizado na análise imunoenzimática, não específico para IgA. Mais avaliações imunológicas precisam ser realizadas com um maior número de animais para verificar a atuação da resposta imunológica de mucosa.

O uso do polímero quitosana para preparação de sistemas de liberação de antígenos pode ser considerado como inovação e está entre as tendências para vacinação. A formulação proposta para administração intranasal da vacina meningocócica C conjugada, descrita no presente estudo, pode ser uma abordagem promissora para vacinas de mucosa, podendo ser utilizada para os demais microrganismos que causam infecções a partir das vias aéreas, estabelecendo assim uma nova plataforma para as imunizações.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível propor uma abordagem de formulação intranasal para vacina meningocócica C conjugada pela metodologia de coacervação utilizando o polímero quitosana, bem como a caracterização e a eficiência das formulações na proteção de camundongos.
- O uso de quitosana no preparo das formulações demonstrou altas taxas de eficiência de encapsulamento, confirmando uma boa interação eletrostática entre a carga positiva da quitosana com a carga negativa do polissacarídeo conjugado.
- A concentração de quitosana em solução influencia na eficiência de encapsulamento da formulação. Este parâmetro pode ser modulado na metodologia de coacervação a fim de se obter uma formulação com proporções adequadas de quitosana-antígeno.
- Na caracterização das partículas formadas, obteve-se um tamanho médio entre 300 nm a 1 μ m, a qual de acordo com estudos prévios publicados é considerada faixa de melhor captura pelas células apresentadoras de antígenos.
- O potencial zeta das formulações demonstrou uma boa estabilidade eletrostática da suspensão. Essa propriedade elétrica demonstra a tendência de repulsão entre as partículas, dificultando a agregação das mesmas. Contudo, é necessário a avaliação da estabilidade dessas formulações.
- A concentração de quitosana 0,25% apresentou melhores atributos das partículas, como menor tamanho e melhor estabilidade, porém menor eficiência de encapsulamento. Já a concentração de quitosana 1,0% demonstrou maior taxa de encapsulamento e resultados satisfatórios de tamanho e estabilidade, sendo selecionada para os testes de identidade e ensaio animal.

- Os experimentos realizados nas técnicas de RMN e Dot blot não foram apropriados para demonstrar a integridade/identidade do IFA.
- A partir dos resultados do ensaio animal podemos verificar a eficiência do polímero quitosana na formulação para a indução de uma resposta imunológica. Além disso, verificamos a importância da via intranasal na proteção dos animais.
- Apesar da necessidade de mais testes de avaliação imunológica, incluindo a atuação do sistema imunológico de mucosa, os resultados obtidos mostraram que a metodologia de formulação proposta pode ser promissora para imunização de mucosa contra *N. meningitidis* do sorogrupo C.

Levando em consideração os resultados e conclusões obtidos no presente trabalho, temos como perspectivas futuras:

- Utilizar quitosana modificada quimicamente, como por exemplo, a carboximetil quitosana ou com maior grau de pureza, a fim de verificar o aumento da eficiência de encapsulamento e diminuir a interferência do polímero nos testes de caracterização.
- Avaliar o impacto de outros sais precipitantes na eficiência de encapsulamento e nos parâmetros de caracterização.
- Estudar a estabilidade da formulação obtida.
- Verificar o potencial da quitosana como adjuvante.
- Realizar um ensaio com maior número de animais.
- Avaliar as respostas imunológicas envolvidas na proteção dos animais por via intranasal, principalmente a atuação do sistema imunológico de mucosa.
- Avaliar as respostas imunológicas envolvidas na proteção dos animais por via intranasal, principalmente a atuação do sistema imunológico de mucosa e a duração da proteção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali A, Jafri RZ, Messonnier N, Tevi-Benissan C, Durrheim D, Eskola J, et al. **Global practices of meningococcal vaccine use and impact on invasive disease.** Pathogens and Global Health 2014; 108(1):11-7.

Amorij JP, Kersten GFA, Saluja V, Tonnis WF, Hinrichs WLJ, Slütter B, et al. **Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives.** Journal of Controlled Release 2012; 161:363-376.

Anderson AS, Jansen KU & Eiden J. **New frontiers in meningococcal vaccines.** Expert Review of Vaccines 2011; 10:617-634.

Argondizzo APC. **Seleção e caracterização de candidatos proteicos para comporem uma vacina contra pneumococo a partir do genoma de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 5.** [Tese] Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Rio de Janeiro 2013.

Assis BG & Silva VL. **Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações.** Polímeros 2003, 4:223-228.

Balayssac S, Trefi S, Gilard V, Malet-Martino M, Martino R, Delsuc MA. **2D and 3D DOSY 1H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction.** Journal Pharm Biomed Anal 2009; 4:602-612.

Bastos CB, Souza IM, Silva MN, Silva FP, Figueira ES, Leal ML, Jessouroun E, Junior JGS, Medronho RA & Silveira IAFB. **Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: Scaling up studies.** Vaccine 2015; 33:4281-4287.

Bhattacharjee S. **DLS and zeta potential – what they are and what they are not?.** Journal of Controlled Release 2016; 235:337-351.

Becka CM & Chacron-Cruz E. **Meningococcal Disease.** Journal Infectious Diseases Therapy 2015; 5:1-7.

Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Santarém N, Sousa A, Borchard G, et al. **Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 69:405-16.

Borrow R, Adab R, Trotter C, Van der Klis FRM & Vazquez JA. **Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes.** Vaccine 2013; 31:4477-86.

Bosis S, Mayer A & Esposito S. **Meningococcal disease in childhood: epidemiology, clinical features and prevention.** J Prev Med 2015; 56:121-4.

Campbel H, Parikh SR, Borrow R, Kaczmarski E, Ramsay ME & Ladhani SN. **Presentation with gastrointestinal symptoms and high case fatality associated with group W meningococcal disease (Men W) in teenagers, England, July 2015 to January 2016.** Euro Surveill 2016; 21:1-4.

Casettari L & Illum L. **Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs.** Journal of Controlled Release 2014; 190:189-200.

Chadwick S, Kriegel C & Amiji M. **Nanotechnology solutions for mucosal immunization.** Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62:394-407.

Cordeiro AS, Alonso MJ & Fuente ML. **Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides.** Biotechnology Advances 2015; 33:1279-1293.

Criado MT, Sánchez S & Ferreirós CM. **Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas.** Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26(9):564-72.

Crofton AR, Hudson SM, Howard K, Pender T, Abdelgawad A, Wolski D & Kirsch WM. **Formulation and characterization of a plasma sterilized, pharmaceutical grade chitosan powder.** Carbohydrate Polymers 2016; 146:420-426.

Csaba N, Garcia-Fuentes M & Alonso MJ. **Nanoparticles for nasal vaccination.** Advanced Drug Delivery Reviews 2009; 61:140-157.

DATASUS. Acessado em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/meninbr.def>, no dia 23 de setembro de 2016 às 15h13min.

Dutta PK, Dutta J & Tripathi VS. **Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications.** Journal of Scientific and Industrial Research 2004; 63:20-31.

Dwilow R & Fanella S. **Invasive Meningococcal Disease in the 21st Century_An Update for the Clinician.** Curr Neurol Neurosci Rep 2015; 15:1-9.

Engstrom E, Martins RM, Maia MLS, Sepulveda C, Camacho LAB, Leal ML, et al. **Phase II clinical study of a Brazilian meningococcal C conjugate vaccine.** Proceedings of the 18th international pathogenic neisseria conference 2012; p 283.

Faraji AH & Wipf P. **Nanoparticles in cellular drug delivery.** Bioorganic & Medicinal Chemistry 2009; 17:2950-62.

Frasch CE, Kapre SV, Lee CH & Pr eaud JM. **Technical development of a new meningococcal conjugate vaccine.** Clinical Infectious Diseases 2015; 61:404-9.

Frases S, Nimrichter L, Viana NB, Nakouzi A & Casadevall A. **Cryptococcus neoformans Capsular Polysaccharide and Exopolysaccharide Fractions Manifest Physical, Chemical, and Antigenic Differences.** American Society for Microbiology 2008; 7:319-327.

Gheesling LL, Carlone GM, Pais LB, Holder PF, Maslanka SE, Plikaytis BD, Achtman M, Densen P, Frasch CE, Kayhty H, et al. **Multicentre comparison of Neisseria meningitidis serogroup C anti-capsular polysaccharide antibody levels measured by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay.** J. Clin. Microbiol. 1994; 32:1475-1482.

Gill P. **Nanocarriers, nanovaccines, and nanobacteria as nanobiotechnological concerns in modern vaccines.** Sharif University of Technology 2013; 20(3):1003-13.

He C, Hu Y, Yin L, Tang C & Yin C. **Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles.** Biomaterials 2010; 31:3657-3666.

Hermanson GT. **Bioconjugate techniques.** Second edition: Academic Press 2008.

Jessouroun E, Silveira IAFB, Laranjeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch, Frasch CE, Castro-Faria-Neto HC & Bozza PT. **Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent N. meningitidis serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock.** Vaccine 2004; 22:2617-2625.

Ji C & Shi J. **Sterilization-free chitosan hydrogels for controlled drug release.** Materials Letters 2012; 72:110-112.

Josefsberg JO & Buckland B. **Vaccine process technology.** Biotechnology and Bioengineering 2012; 109(6):1443-5.

Joshi VS, Bajaj IB, Survase AS, Singhal RS & Kennedy JF. **Meningococcal polysaccharide vaccines: A review.** Carbohydrate Polymers 2009; 75:553-565.

Karch CP & Burkhard P. **Vaccine Technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies.** Biochemical Pharmacology 2016; 1-12.

Kim MG, Park JY, Shon Y, Kim G, Shim G & Oh YK. **Nanotechnology and vaccine development.** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 2014; 9:227-235.

Koppolu BP & Zaharoff DA. **The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells.** Biomaterials 2013; 34:2359-2369.

Koppolu BP, Smith SG, Ravindranathan S, Jayanthi S, Kumar TKS & Zaharoff DA. **Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery.** Biomaterials 2014; 35:4382-4389.

Kumar A, Vimal A & Kumar A. **Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery.** International Journal of Biological Macromolecules 2016; 91:615-622.

Lamichhane A, Azegami T & Kiyono H. **The mucosal immune system for vaccine development.** Vaccine 2014; 32:6711-23.

Lee JA, Kim YM, Kim TH, Lee SH, Lee CA, Cho CW, Jeon JW, Park JK, Kim SK, Jung BG & Lee BJ. **Nasal delivery of chitosan-coated poly (lactide-co-glycolide)-encapsulated honeybee (*Apis mellifera*) venom promotes th 1-specific systemic and local intestinal immune responses in weaned pigs.** Veterinary Immunology and Immunopathology 2016; 178:99-106.

Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. **Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials.** Biotechnology Advances 2014; 32:711-726.

Lycke N. **Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations.** Nature 2012; 12:592-605.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. **Protein measurement with the Folin-Phenol reagent.** J. Biol. Chem 1951; 1:265-275.

Martins RM, Barbosa GG, Maia MLS, Engstrom E, Camacho LAB, Perisse AR et al. **Phase I study of a meningococcal C strain 2135 conjugate vaccine.** Proceedings of the 17th international pathogenic neisseria conference 2010; p 169.

McNeela EA, O'Connor D, Gill IJ, Davis SS, Pizza M, Peppoloni S, Rappouli R & Mills KH. **A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (crm(197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery.** Vaccine 2000; 19:1188-1198.

Mouez MA, Zaki NM, Mansour S & Geneidi AS. **Bioavailability enhancement of verapamil HCl via intranasal chitosan microspheres.** European Journal of Pharmaceutical Sciences 2014; 51:59-66.

Neutra MR & Kozlowski PA. **Mucosal vaccines: the promise and the challenge.** Nature Publishing Group 2006; 6:148-158.

Patel VR & Agrawal YK. **Nanosuspension: an approach to enhance solubility of drugs.** Pharm. Technol. 2011; 2:81-87.

Pavot V, Rochereau N, Genin C, Verrier B & Paul Stéphane. **New insights in mucosal vaccine development.** Vaccine 2012; 30:142-154.

Plotkin S. **Vaccines: past, present and future.** Nature medicine 2005; 11:5-9.

Plotkin S. **History of vaccination.** Special Feature: Perspective 2014; 34:12283-12287.

Pollard AJ, Perrett KP & Beverley PC. **Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines.** Nature Reviews Immunology 2009; 3:213-220.

Raymond J. **Bactériologie de *Neisseria meningitidis*.** Archives de Pédiatrie 2012; 19:55-60.

Rázga F, Vnuková D, Némethová V, Mazancová P & Lacík I. **Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations.** Carbohydrate Polymers 2016; 151:488-499.

Redigueri CF, Sassonia RC, Dua K, Kikuchi IS & Pinto TJA. **Impacto f sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering.** European Polymer Journal 2016; 82:181-195.

Renukaradhya GJ, Marasimhan B & Mallapragada SK. **Respiratory nanoparticle-based vaccines and challenges associated with animal models and translation.** Journal of Controlled Release 2015; 219:622-631.

Sant`Ana GCF. **Microencapsulamento de penicilina g para tratamento profilático da febre reumática** [Tese] Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 2013.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL & Pohlmann AR. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de farmacos.** Química Nova 2003; 26:726-737.

Shakya AK, Chowdhury MYE, Tao W & Gill HS. **Mucosal vaccine delivery: current state and a pediatric perspective.** Journal of Controlled Release 2016; 240:394-413.

Siadat SD & Norouzian D. **Meningococcal vaccines: past, presente, and future perspectives.** Journal Infect Developing Countries 2007; 1(2):129-146.

Sifontes S, Infante JF, Perez P, Caro E, Sierra G & Campa C. **The hyperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA-MENGOC-BC against *Neisseria meningitidis* B clinical isolates.** Arch. Med. Res. 1997; 28:41-45.

Silveira IAFB, Bastos RC, Neto MS, Laranjeira AP, Assis EF, Fernandes SAR, Leal ML, Silva WC, Lee CH, Frasc CE, Peralta JM & Jessouroun E. **Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid.** Vaccine 2007; 25:7261-70.

Smith PK. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** Anal Biochem 1985; 150:76-85.

Soarez PC, Sartori AMC, Nóbrega LAL, Itria A & Novaes HMD. **Cost-effectiveness analysis of a universal infant immunization program with meningococcal C conjugate vaccine in Brazil.** Value Health 2011; 14:1019-1027.

Souza IM. **Separação e quantificação de proteína e polissacarídeo livres na vacina meningocócica C conjugada brasileira utilizando eletroforese capilar.** [Tese] Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro 2011.

Stefanelli P, Fazio C, Neri A, Boros S, Renna G & Pompa MG. **Changing epidemiology of Infant Meningococcal Disease after the introduction of meningococcal serogroup C vaccine in Italy.** *Vaccine* 2015; 33:3678-3681.

Svennerholm L. **Quantitative estimation of sialic acids II a colorimetric resorcinol hydrochloric acid method.** *Biochim biophys* 1957; 24: 604-611.

Tauil MC, Carvalho CSR, Vieira AC & Waldman EA. **Meningococcal disease before and after the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccine. Federal District, Brasil.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2014; 18 (4): 379-386.

University of Leicester. **Imagem da bactéria *N. meningitidis*.** Disponível em: <http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/schoolscolleges/topics/microbial-genetics-/human-pathogens-1/neisseria-meningitidis>. Acessado em 27/06/2017.

Vipond C, Care R & Feavers IM. **History of meningococcal vaccines and their serological correlates of protection.** *Vaccine* 2012; 30:10-17.

Weninger BG & Papania MJ. **Alternative vaccine delivery methods.** *Vaccines*. Quinta edição 2008; capítulo 61.

Willis LM & Whitfiels C. **Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways.** *Carbohydrate Research* 2013; 378:35-44.

Yezli S, Saeed AAB, Assiri AM, Alhakeem RF, Yunus MA, Turkistani AM, Booy R & Alotaibi BM. **Prevention of meningococcal disease during the Hajj and Umrah mass gatherings: past and current measures and future prospects.** *Journal of Infectious Diseases* 2015; 1-8.

Yoshida JT. **Nanopartículas de quitosana como veículo de vacinação contra a Hepatite B por via nasal.** [Tese] Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo 2012.

Xia Y, Fan Q, Hao D, Wu J, Ma G & Su Z. **Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean.** *Vaccine* 2015; 33:5997-6010.

Xu JH, Dai WJ, Chen B & Fan XY. **Mucosal immunization with PsaA Protein, using chitosan as a delivery system, increases protection against acute otitis media and invasive infection by *Streptococcus pneumoniae*.** Journal of Immunology 2015; 177-185.

Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C & Middelberg APJ. **Nanoparticle vaccines.** Vaccine 2014; 32:327-337.