

Utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações com a vacina para hepatite B

Nanostructured SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with hepatitis B vaccine

Karina Scaramuzzi¹, Denise Cristina André Oliveira², Luciana Vieira Carvalho¹, Denise Vilarinho Tambourgi¹, Elisabeth Christina Nunes Tenório², Marisa Rizzi³, Juliana Mussalem³, Márcia Carvalho de Abreu Fantini⁴, Viviane Fongaro Botosso², Osvaldo Augusto Sant'Anna¹

RESUMO

Objetivo: Demonstrar a aplicabilidade da sílica do tipo SBA-15 como adjuvante nas imunizações com a proteína recombinante HBsAg do vírus da hepatite B, principal componente da vacina Butang[®] produzida pelo Instituto Butantan. **Métodos:** Camundongos BALB/c receberam, pela via oral ou subcutânea, 0,5 µg do HbsAg adsorvido/encapsulado à SBA-15 ou adsorvido ao Al(OH)₃. Para avaliar a resposta imune secundária, uma dose de reforço foi administrada subcutaneamente 30 dias após a primeira imunização. Amostras individuais de soro e fezes foram coletadas periodicamente para titulação de anticorpos específicos por ELISA. **Resultados:** A análise de IgA secretada mostrou que camundongos imunizados pela via oral com HbsAg em SBA-15 apresentaram aumento nos níveis de anticorpos específicos nas respostas primária e secundária. Ainda, após o reforço, observaram-se maiores níveis de IgA e IgG séricas anti-HBsAg no grupo preparado com HBsAg:SBA-15 pela via oral. Todos os grupos imunizados apresentaram maior produção de IgG1. **Conclusão:** Os resultados indicam o uso promissor da sílica SBA-15 como adjuvante, especialmente nas imunizações pela via oral.

Descritores: Hepatite B; Vacinação oral; Adjuvantes; Memória imunológica

ABSTRACT

Objective: To evaluate the applicability of SBA-15 silica as an adjuvant in immunizations with purified particles of the viral protein HBsAg, the main component of hepatitis B vaccine, Butang[®], produced by

Instituto Butantan. **Methods:** BALB/c mice orally or subcutaneously received 0.5 µg of HBsAg adsorbed/encapsulated to SBA-15 or adsorbed to Al(OH)₃. To assess the secondary immune response, a subcutaneous booster was administered 30 days after the first immunization. Individual serum and fecal samples of each group were periodically collected for specific antibody titration by ELISA. **Results:** Analysis of secretory IgA showed that mice orally primed with HBsAg on SBA-15 had increased levels of specific antibodies in primary and secondary immune responses. Specific serum IgA and IgG titers in HBsAg:SBA-15-orally immunized mice reached higher levels after the booster, demonstrating the effectiveness of oral vaccination with the use of silica. All immunized groups showed higher IgG1 levels. **Conclusion:** Our results clearly indicate the promising use of SBA-15 as an adjuvant, especially in oral immunizations.

Keywords: Hepatitis B; Oral vaccination; Adjuvants; Immunological memory

INTRODUÇÃO

Apesar da disponibilidade de vacinas profiláticas eficientes, a infecção pelo vírus da hepatite-B humano (HBV) e suas doenças associadas ainda representam um problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de dois bilhões de pessoas mundialmente têm evidências de uma infecção prévia ou atual por HBV, e mais de 350 milhões de pessoas têm infecção crônica por HBV. Estima-se ainda de 1 a 1,5 milhões de mortes por ano

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan – São Paulo (SP), Brasil.

² Setor de Hepatite, Instituto Butantan – São Paulo (SP), Brasil.

³ Farmacêutica Cristália – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Departamento de Física Aplicada, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Osvaldo Augusto Sant'Anna – Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan – São Paulo (SP), Brasil – Tel.: 11 3726-7222 - ramal: 2001 – E-mail: gbrasil@usp.br

*Este trabalho faz parte da Patente Internacional WO 07030901

Data de submissão: 27/6/2011 – Data de aceite: 25/11/2011

Conflito de interesse: não há

por doenças hepáticas relacionadas ao HBV, como cirrose e câncer hepáticos⁽¹⁻⁵⁾.

HBV é um pequeno vírus com envelope de DNA que pertence à família *Hepadnaviridae*. A partícula infecciosa contém um núcleo capsídeo icosaédrico que consiste de DNA circular revestido por um envelope de dupla camada lipídica em que são inseridas proteínas grandes (G), médias (M), e pequenas (P). Além das partículas virais contagiosas, as células infectadas pelo HBV produzem grande quantidade de partículas subvirais não infecciosas de forma esférica ou filamentosa com 22 nm de diâmetro^(6,7).

A prevenção por vacinação é uma estratégia singular e eficaz para evitar a doença. Vários fabricantes de vacinas usaram tecnologia de DNA recombinante para expressar a proteína de superfície S do HBV (HBsAg) em leveduras. Em 1996, o Instituto Butantan iniciou a produção da vacina recombinante para hepatite B, que também contém partículas altamente purificadas da proteína recombinante S de superfície adsorvidas em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). Essa vacina, Butang[®], tem a mesma eficácia e segurança que as vacinas importadas e também emprega técnicas de engenharia genética usando leveduras *Hansenella polymorpha* como vetores biológicos. Esse sistema realçou a expressão proteica de quatro a dez vezes e diminuiu os custos finais da vacina de modo significativo⁽⁸⁾.

Embora considerado eficiente e inócuo, o adjuvante no preparo de Butang[®], o Al(OH)₃ pode levar a efeitos colaterais como inflamação local exacerbada, granuloma e até necrose. Ademais, o alume suscita de forma predominante a polarização da resposta imune T_{H2}, que é menos eficaz contra infecções virais^(9,10).

Portanto, há um interesse crescente em investigar novas estratégias de imunização e, em especial, o desenvolvimento de adjuvantes que não interfiram na polarização da resposta imune, além de serem seguros, viáveis em termos econômicos, quimicamente estáveis, e capazes de modular de forma positiva a resposta imune de indivíduos que respondem pouco, como os idosos e os imunodeprimidos^(9,10).

Já que a via natural da maioria das infecções é através da mucosa, e a imunização pela mucosa é o meio mais eficaz de imitar a indução da proteção natural, é importante salientar todos os benefícios de imunizações sem agulhas. As vacinas orais são facilmente administradas e os efeitos colaterais são mínimos. Infelizmente, em função do meio ambiente gástrico hostil, o desenvolvimento de resposta imunológica local e sistêmica é prejudicado⁽¹¹⁻¹⁶⁾.

As partículas de SBA-15 têm uma estrutura altamente organizada e, por causa de suas propriedades físico-químicas, apresentam um grande potencial para aplicação em diferentes áreas. Esses materiais são capazes de interagir com átomos, íons e moléculas, não

apenas na superfície, mas também dentro dos nanoporos de aproximadamente 10 nm de diâmetro⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Essa sílica é sintetizada em meio ácido e tem uma estrutura com notável estabilidade térmica, hidrotérmica, e mecânica (Figura 1). Recentemente, nosso grupo demonstrou o potencial adjuvante de SBA-15 e hoje há vários estudos promissores em curso no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan^(20,21).

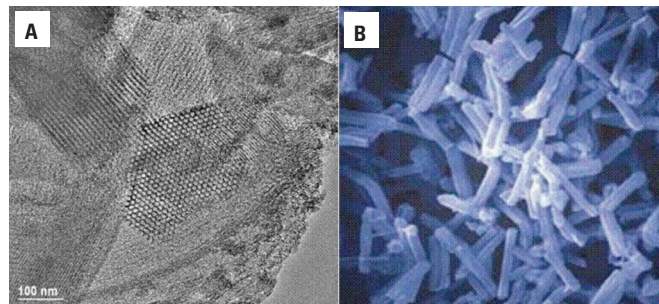


Figura 1. SBA-15 sílica mesoporosa nanoestruturada. (A) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de sílica SBA-15, com destaque para a estrutura porosa hexagonal organizada com diâmetro médio de poro de aproximadamente 10 nm. (B) Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de partículas de SBA-15 de cerca de 30 μm de diâmetro, mostrando a morfologia macroporosa

OBJETIVO

Avaliar a aplicabilidade de sílica SBA-15 como adjuvante em imunizações com partículas purificadas da proteína viral HBsAg, o principal componente da vacina contra hepatite B, Butang[®], produzido pelo Instituto Butantan.

MÉTODOS

Animais

Fêmeas BALB/c isogênicas de camundongos com 8 a 12 semanas de vida, fornecidas pelo Instituto Butantan, foram mantidas no biotério do Laboratório de Imunoquímica, sob condições éticas, segundo as regras internacionais de cuidados de animais (*International Animal Welfare Recommendations*)⁽²²⁾. Todos os experimentos em animais foram aprovados pelos Comitês de Ética de Uso e Cuidado de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e do Instituto Butantan.

Síntese de sílica SBA-15

As amostras de SBA-15 foram sintetizadas usando um copolímero tribloco de poli-(óxido de etileno)-poli-(óxido de propileno)-poli-(óxido de etileno) (*Pluronic P123, EO₂₀PO₇₀EO₂₀, M_{av} = 5800* - BASF Chemical Co., Mount Olive, NJ, EUA) como molde de micelas. A fonte de sílica para polimerização foi tetraetil ortossilicato (TEOS), adquirido de *Fluka/Sigma Chemical Co.* (Milwaukee, WI, EUA). O ácido clorídrico foi comprado

da *Fisher Scientific Co.* (Pittsburgh, PA, EUA). A caracterização de síntese e adsorção das amostras foi feita conforme descrição por Matos et al.⁽²³⁾.

Imunização de camundongos

Os camundongos BALB/c ($n = 5/\text{grupo}$) receberam, por injeção subcutânea (SC) ou gavagem, $0,5 \mu\text{g}$ da proteína HBsAg adsorvida ou não em SBA-15 em um volume final de $0,25 \text{ mL}$ de PBS. O HBsAg foi misturado na proporção de 1:10 antígeno: SBA-15, v/v ($0,5 \mu\text{g}$ e $5 \mu\text{g}$, respectivamente). As misturas foram mantidas em repouso a 4°C por 24 horas antes das imunizações. Como controles, avaliamos os níveis de anticorpos específicos em animais não imunizados. Os camundongos também foram imunizados subcutaneamente com $0,5 \mu\text{g}$ do HBsAg adsorvido em $6,25 \mu\text{g Al(OH)}_3$, em um volume final de $0,25 \text{ mL}$ para análises comparativas futuras. Para avaliar a resposta imune secundária, todos os grupos experimentais receberam uma segunda dose subcutânea do antígeno, adsorvido ou não em SBA-15 ou Al(OH)_3 , 30 dias após a primeira dose.

Amostras individuais de sangue do plexo venoso retro-orbital e amostras fecais foram periodicamente coletadas para detecção de títulos de anticorpos específicos e posterior quantificação por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Coleta de extrato de pellets fecais

Pellets fecais frescos de camundongos imunizados com BALB/c por via oral foram coletados e pesados. Cinco mililitros de uma solução inibitória (fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF) 1 mM foram adicionados, BSA a 1% em PBS por 1 g de *pellet* fecal. Após 15 minutos, o material foi vigorosamente misturado em vórtice e as amostras foram centrifugadas a $20.000 \bar{x} \text{ g}$ por 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e guardados à temperatura de -80°C até o ensaio por ELISA.

ELISA para anticorpos anti-HBsAg

Microplacas com propriedades de alta ligação (*Maxisorp Nunc International*, Rochester, NY, EUA) foram revestidas com $1,5 \mu\text{g/mL}$ de HBsAg diluído em tampão de carbonato-bicarbonato com pH 9,6 e incubadas por 1 hora a 37°C , que depois foi alterado para 4°C por 18 horas. A seguir, as placas foram lavadas com PBS contendo $0,05\%$ Tween (PBS-T) e depois bloqueados com $0,5\%$ de gelatina em PBS por 2 horas a 37°C . O procedimento de lavagem foi repetido. As amostras foram distribuídas, diluídas em série em PBS-T/gelatina $0,5\%$, e incubadas por 1 hora, a 37°C , a fim de quantificar IgG e seus isótopos, e por 18 horas, para IGA sérica e secretada. As microplacas foram submetidas a outro procedimento de lavagem e foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de anti-IgG (diluição 1:2000), anti-IgG1 e anti-IgG2a

(diluídos a 1:1000), ou anti-IgA (diluído a 1:500) rotulados com peroxidase (*Promega Co.*, Madison, WI, EUA). As placas foram lavadas e incubadas no escuro, à temperatura ambiente, com um substrato tampão (20 mg OPD diluído em 40 mL de tampão de citrato-fosfato com pH 5,0; H_2O_2 a $0,3\%$). A reação foi interrompida com $50 \mu\text{L/poço}$ de ácido cítrico $0,2 \text{ M}$ e a absorbância foi medida a 450 nm usando o leitor ELISA (*Multiskan - Labsystems*, Helsinki, Finlândia). Os títulos foram calculados desconsiderando 20% da absorbância de diluição da saturação e foram expressos como \log_2 .

Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* não pareado e fixada em $p < 0,05$, usando o programa GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

Resposta específica de anticorpo anti-HBsAgc

Imunização subcutânea

Para a avaliação de IgG específica e seus isótipos, amostras sanguíneas foram periodicamente coletadas para titulação de anticorpos. Após a primeira dose, 7, 14, e 30 dias, nenhum nível de anticorpo sérico foi detectado em qualquer dos grupos experimentais. Os níveis de IgG, após o reforço, medidos 7, 14, e 30 dias após a segunda dose foram maiores em ambos os grupos, de SBA-15 ($5,2 \log_2$, $7,8 \log_2$, e $9 \log_2$) e de Al(OH)_3 ($11 \log_2$, $11 \log_2$, e $9,6 \log_2$). Foi detectada uma diferença significativa nos títulos de IgG entre os grupos no dia 7 após o reforço ($p < 0,05$), que mostravam melhor resposta humoral após imunização subcutânea com Al(OH)_3 (Figura 2A). Assim, está patente que ambos os adjuvantes levaram à soroconversão.

Respostas de subclasses específicas de IgG foram avaliadas em ambos os grupos imunizados por via subcutânea, após a segunda dose nos dias 7, 14, e 30 após as imunizações. Os títulos anti-HBsAg de IgG1 foram igualmente altos, tanto nos grupos HBsAg: Al(OH)_3 ($10,2 \log_2$, $12,5 \log_2$, e $12 \log_2$) quanto no HBsAg:SBA-15 ($7,4 \log_2$, $10,4 \log_2$, e $9 \log_2$) (Figura 2B). Entretanto, no dia 7 após a imunização, uma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p < 0,05$), indicando claramente que os animais que receberam a formulação com Al(OH)_3 apresentaram níveis mais elevados de IgG1 (Figura 2B).

Os títulos específicos de IgG2a, detectados 7, 14, e 30 dias após o reforço, foram $8 \log_2$, $8,5 \log_2$, e $7,8 \log_2$, respectivamente, no grupo Al(OH)_3 , e $5,8 \log_2$, $6,6 \log_2$, $6,8 \log_2$ no grupo de sílica (Figura 2C).

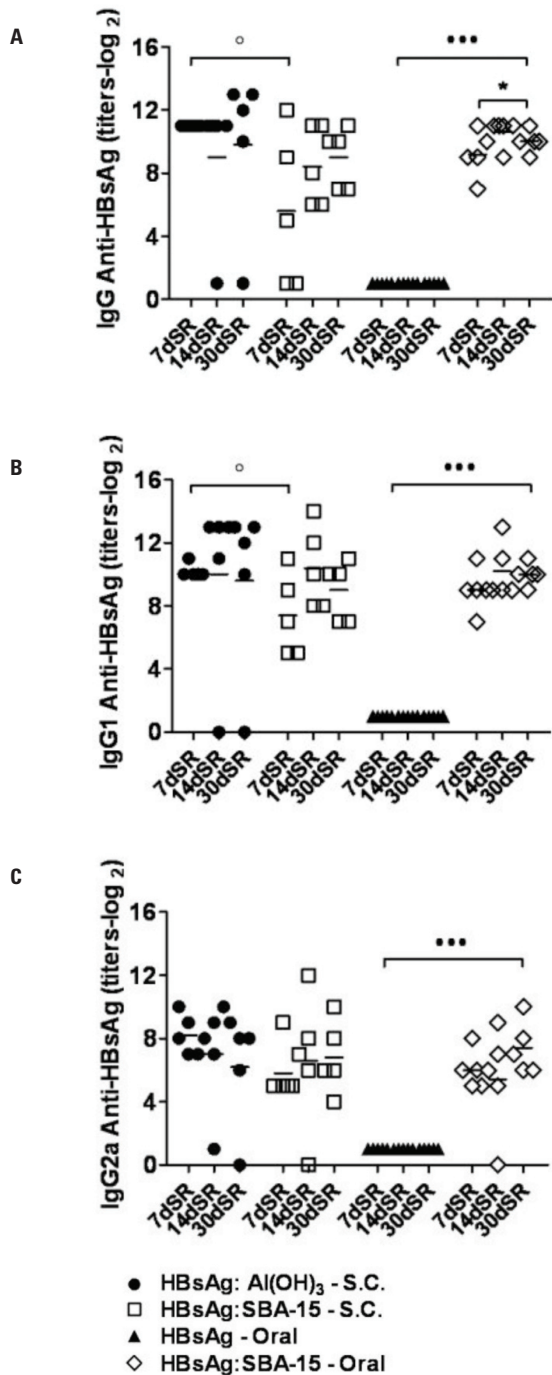


Figura 2. Produção de anticorpos por camundongos BALB/c imunizados por via oral ou subcutânea. (A) Níveis séricos de IgG, (B) IgG1, (C) IgG2a anti-HBsAg (n = 5 animais/grupo). Títulos de anticorpos medidos por ELISA, nos 7, 14 e 30 dias depois do reforço, administrado por via subcutânea, 30 dias após a primeira imunização. O grupo de animais imunizados com rHBsAg foi utilizado como referência para a análise do teste *t* de Student não pareado, **p* < 0,05; ****p* < 0,001. Títulos de anticorpos nos dias 7, 14 e 30 após o reforço também foram usados como referência para análise pelo teste *t* de Student não pareado, ° *p* < 0,05

Animais imunizados com Al(OH)₃ mostraram títulos mais altos de anti-HBsAg IgG1 em comparação com IgG2a, com diferença estatística (*p* < 0,05), demonstrando uma discreta predominância de uma resposta T_H2 (Figura 3).

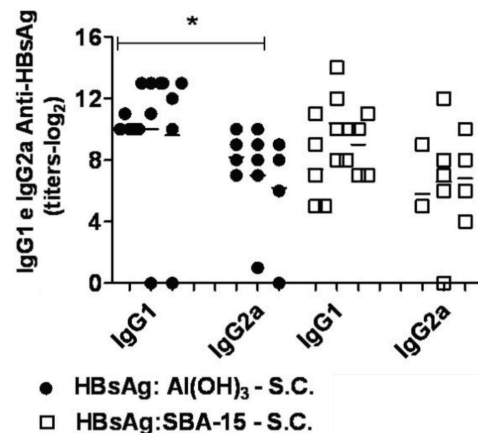


Figura 3. Produção de anticorpo IgG1 e IgG2a por camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea. Níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-HBsAg (n = 5 animais/grupo). Títulos de anticorpos medidos por ELISA 7, 14 e 30 dias após o reforço, administrados por via subcutânea 30 dias após a primeira imunização. As respostas de IgG1 e IgG2a entre os grupos foram usadas como referência para análise pelo teste *t* de Student não pareado, **p* < 0,05

Imunização oral

Para determinar o uso de SBA-15 como adjuvante oral, camundongos BALB/c foram imunizados com HBsAg em PBS ou HBsAg adsorvido em sílica. Após a primeira administração, nenhum título de anticorpo sérico específico (IgG, IgG1, IgG2a, e IgA) foi detectado em qualquer um dos grupos.

Os soros coletados 7, 14, e 30 dias após a segunda imunização SC foram avaliados quanto à IgG específica e suas respostas de isótipos. Os camundongos imunizados apenas com HBsAg não mostraram soroconversão (Figura 2A).

Por outro lado, a resposta IgG no grupo HBsAg:SBA-15 foi maior: 9,2 log₂, 10,6 log₂, e 10 log₂ nos dias 7, 14, e 30 após o reforço, demonstrando uma diferença estatística 14 dias após a segunda dose, em comparação com os primeiros 7 dias (*p* < 0,001) (Figura 2A). Os títulos anti-HBsAg de IgG1 foram 9 log₂, 10,2 log₂, 10 log₂; enquanto os títulos de IgG2a foram 6 log₂, 6,2 log₂, 7,4 log₂ (Figura 4) nos animais imunizados com sílica. Os camundongos imunizados sem SBA-15 não responderam. Após a primeira imunização oral com HBsAg:SBA-15, houve uma predominância de resposta T_H2, com maior produção de IgG1 (9,7 log₂) em vez de IgG2a (6,4 log₂) (*p* < 0,005) (Figura 4).

Títulos séricos específicos de IgA apenas foram detectados no grupo HBsAg:SBA-15, 10 dias após o reforço por via subcutânea (4,5 log₂) (Figura 5A).

A análise de IgA secretória (s-IgA) mostrou que os títulos de anticorpos do grupo imunizado oralmente com HBsAg:SBA-15 foram maiores que os níveis de s-IgA do grupo imunizado sem sílica. Dez dias após a primeira imunização, os títulos de s-IgA foram 3 log₂ no grupo HBsAg:SBA-15 e permaneceram estáveis após o reforço SC (Figura 5B).

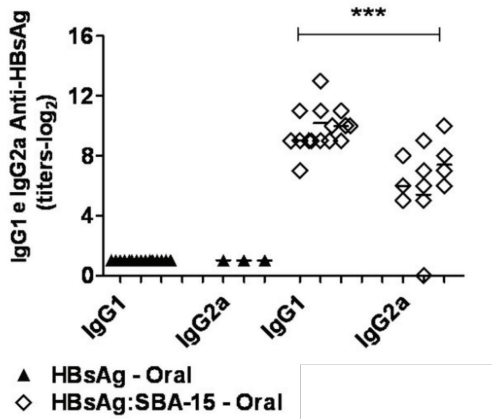


Figura 4. Produção de anticorpo IgG1 e IgG2a por camundongos BALB/c imunizados por via oral. Níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-HBsAg (n = 5 animais/grupo). Títulos de anticorpos medidos por ELISA 7, 14 e 30 dias após o reforço, administrados por via subcutânea 30 dias após a primeira imunização. As respostas de IgG1 e IgG2a entre os grupos foram usadas como referência para análise pelo teste t de Student não pareado, *** p < 0,05

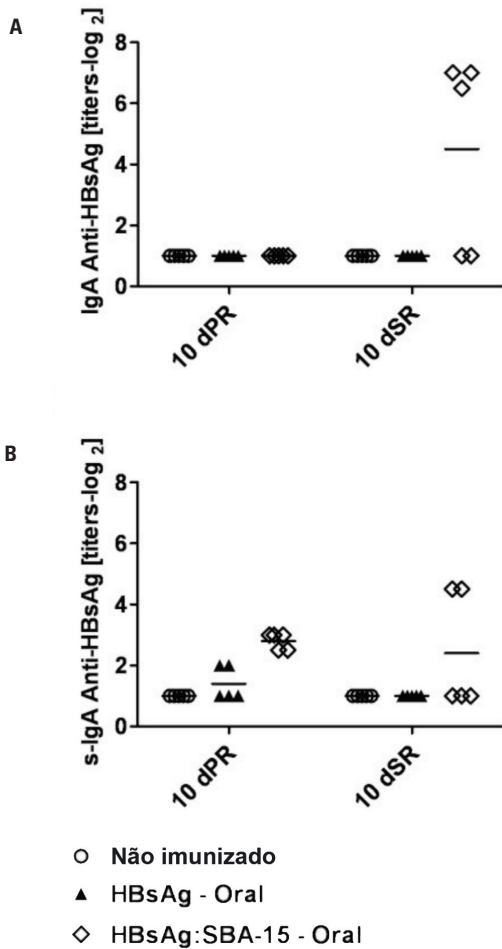


Figura 5. Produção de anticorpo por camundongos BALB/c imunizados por via oral ou subcutânea. (A) Níveis secretórios de IgA (s-IgA) e (B) níveis séricos de IgA anti-HBsAg (n = 5 animais/grupo). Títulos de anticorpos medidos por ELISA durante as respostas imunes primária e secundária. O reforço subcutâneo foi administrado 30 dias após a primeira imunização oral. Grupos de animais imunizados e não imunizados com rHBsAg foram usados como referência para análise pelo teste t de Student não pareado

DISCUSSÃO

O sistema imunológico é uma rede complexa que envolve ativação, regulação e supressão, características resultantes de interações que envolvem células e moléculas. Essa rede essencialmente pleiotrópica é controlada por polimorfismo gênico de altos valores adaptativos de características (MHC, Sistema do Complemento, genes que regulam as expressões de variadas regiões de imunoglobulina), e as principais funções imunobiológicas (produção de anticorpos, reatividade inflamatória, tolerância) são submetidas a controles poligênicos que são, pelo menos parcialmente, independentes.

A influência de fatores ambientais na expansão de doenças infecciosas, tais como a introdução de novos antibióticos e vacinas que exercem pressão seletiva sobre um dado patógeno, muda as taxas de resistência de um micro-organismo. Há outros fatores ambientais que agem tanto na capacidade e na intensidade da responsividade imunológica a um dado imunógeno, modulando as características determinadas geneticamente. Esse é o caso dos adjuvantes, quer sejam artificiais ou naturais.

Por isso é tão importante estabelecer cronogramas eficientes de vacinação, com planejamento apropriado de doses de antígenos e intervalos adequados entre as imunizações⁽²⁴⁾.

Além da eficiência de todas as vacinas disponíveis comercialmente contra a hepatite B, é sempre importante considerar alternativas para diminuir os reforços e os custos por dose. Ademais, a possibilidade de desenvolver vacinas administradas por via oral é de grande importância. Imunizações sem uso de agulhas têm um amplo espectro de vantagens em relação a outras vias de administração. Todavia, há limitações para o sucesso de uma vacina oral. Os antígenos proteicos geralmente falham em gerar respostas imunes locais e sistêmicas detectáveis, em função do meio gástrico hostil⁽¹⁵⁾.

Resultados recentes obtidos de imunizações orais com vacinas para hepatite A e gama globulina humana (HGG) adsorvida em SBA-15 demonstraram a aplicabilidade de SBA-15 como suporte de antígenos, protegendo os epítomos contra degradação e permitindo o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente e específica⁽²⁵⁾.

Ao comparar a formulação que usa Al(OH)₃ como adjuvante de sua proteína recombinante HBsAg adsorvida em SBA-15, ficou claro que, após imunizações SC, foi obtida uma forte resposta de anticorpo contra HBsAg. Mesmo assim, quando primeiramente administramos uma dose por via oral com a proteína recombinante em sílica, ficou claro que o sistema imunológico estava preparado, levando a uma resposta humoral igual em comparação à imunização parenteral (Figura 2). Sabe-se que as doses maiores de

antígenos ou a repetição da vacina não necessariamente resultaram em proteção. Conseqüentemente, este é um resultado significativo quando consideramos a combinação da administração oral e parenteral. Talvez seja possível diminuir o número de doses de vacina, já que a produção de anticorpos foi detectada após a segunda injeção de reforço e não apenas após uma terceira dose, como é comum. Além disso, será possível introduzir imunizações orais no esquema de vacinas.

Outro fator relevante é que após a primeira imunização oral, foi identificada boa produção local de anticorpos (s-IgA), provando sua eficácia e fortalecendo nossos planos de estudar o uso dessa sílica em vacinas orais (Figuras 4 e 5). Após o preparo por via oral, é possível que células imunológicas específicas tenham sido ativadas, levando ao desenvolvimento bem sucedido de memória imunológica.

Já se sabe que o HBsAg tende a induzir uma resposta imune de T_H2 com uma grande produção de IgG1. Este padrão de T_H2 pode se dever, em parte, à administração subcutânea e à presença de $Al(OH)_3$ na formulação da vacina⁽²⁶⁾.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos corroboram a ideia de uso promissor de SBA-15 sílica como um adjuvante/veículo, mesmo para imunizações orais. Quando comparado a vacinas para o HBV atualmente em uso, SBA-15 poderia antecipar e realçar a resposta humoral após imunizações orais e subcutâneas com uma discreta predominância de resposta imune tipo T_H2 . Em imunizações orais, acredita-se que essas partículas ajam na proteção física de antígenos ou epítomos imunodominantes, auxiliando em sua liberação vagarosa e ativação eficiente do sistema imunológico, e na indução competente dessa memória imunológica.

SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho recebeu suporte de fundos do Programa INCTTOX do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Farmacêutica Cristália, e Fundação Butantan - Brasil.

REFERÊNCIAS

- Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):65-73.
- Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, et al. Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. *PLoS One*. 2008;3(8):e2954.
- Schmeltzer P, Sherman KE. Occult hepatitis B: clinical implications and treatment decisions. *Dig Dis Sci*. 2010;55(12):3328-35.
- Thielen S, De Clercq N, Tornieporth N. A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system. *Vaccine*. 2001;19(17-19):2400-3.
- West DJ, Calandra GB. Vaccine induced immunologic memory for hepatitis B surface antigen: implications for policy on booster vaccination. *Vaccine*. 1996;14(11):1019-27.
- Gerlich WH, Bremer C, Saniewski M, Schuttler CG, Wend UC, Willems WR, et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig Dis*. 2010;28(1):116-25.
- Glebe D. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):8-13.
- Ishimoto LM, Rissato ML, Bonilha VS, Miyaki C, Raw II, Granovski N. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine ButaNG in adults. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1999;41(3):191-3.
- Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett*. 2006;102(1):10-5.
- Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 1997;15(3):248-56.
- Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen FE, Nilsen EM, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*. 1999;20(3):141-51.
- Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:232-59.
- Jepson MA, Clark MA, Foster N, Mason CM, Bennett MK, Simmons NL, et al. Targeting to intestinal M cells. *J Anat*. 1996;189(Pt 3):507-16.
- Kraehenbuhl JP, Corbett M. Immunology. Keeping the gut microflora at bay. *Science*. 2004;303(5664):1624-5.
- Shalaby WS. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;74(2):127-34.
- Yeh P, Ellens H, Smith PL. Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;34(2-3):123-33.
- Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 1992;359(1):710-2.
- Yang H, Coombs N, Ozin GA. Morphogenesis of shapes and surface patterns in mesoporous silica. *Nature*. 1997;386(1):692-5.
- Zhao D, Feng J, Huo Q, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores. *Science*. 1998;279(5350):548-52.
- Carvalho LV, Ruiz R de C, Scaramuzzi K, Marengo EB, Matos JR, Tambourgi DV, et al. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine*. 2010;28(50):7829-36.
- Mercuri LP, Carvalho LV, Lima FA, Quayle C, Fantini MC, Tanaka GS, et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. *Small*. 2006;2(2):254-6.
- Giles AR. Guidelines for the use of animals in biomedical research. *Thromb Haemost*. 1987;58(4):1078-84.
- Matos JR, Mercuri LP, Kruk M, Jaroniec M. Toward the synthesis of extra-large-pore MCM-41 analogues. *Chem Mater*. 2001;13(11):1726-31.
- Scaramuzzi K, Pagani E, Scivoletto R, Fantini MCda, Sant'Anna OA. Uma história contada no futuro: complexo imunogênico constituído por antígenos vacinais adsorvidos/encapsulados em sílica mesoporosa nanoestruturada. *Cadernos de História da Ciência*. 2010;5(1):57-66.
- Scaramuzzi K. Aplicação da sílica nanoestruturada SBA-15 nas imunizações pela via oral [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
- Lobaina Y, Trujillo H, Garcia D, Gambe A, Chacon Y, Blanco A, et al. The effect of the parenteral route of administration on the immune response to simultaneous nasal and parenteral immunizations using a new HBV therapeutic vaccine candidate. *Viral Immunol*. 2010;23(5):521-9.