UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas
e nanopartículas metálicas**

Daniela Spuri Bernardi

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas
e nanopartículas metálicas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientado(a): Daniela Spuri Bernardi

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Fonseca
Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bernardi, Daniela Spuri

Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas. Ribeirão Preto, 2015.
162 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Lopez, Renata Fonseca Vianna

1. Lipossomas. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Imunização transcutânea. 4. Iontoforeses. 5. Ovalbumina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Spuri Bernardi

Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas filhas Beatriz e Gabriela e ao meu marido Gustavo, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho juntamente com pessoas competentes e especiais.

À Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopez pela brilhante orientação, oportunidade, colaboração, e amizade. Jamais esquecerei os ensinamentos, as valiosas discussões e profissionalismo que a senhora me passou. Muito obrigada de coração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (números de processo 2011/13307-1 e 2012/05177-1) e Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas concessões de bolsas de Doutorado no país e auxílio financeiro concedido à esse grupo.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli, por ter aberto as portas de seu laboratório para realização dos estudos de imunização *in vivo*.

À Prof^a. Dr^a. Claudia Bittencourt, pelo auxílio fundamental nos experimentos de imunização *in vivo*.

Ao Prof. Dr. José Carlos Alves Filho da Faculdade de Medicina pela orientação e auxílio na execução dos experimentos de OVA-*Recall* e recrutamento de células apresentadoras de antígenos.

Aos amigos e colegas de laboratório: Tatiana, Karina, Raquel, Camila Cubayachi, Camila Lemos, Danielle, Yomi, Francieli, Luciana, Joel, Estael, Laura e Marcela pela boa convivência, discussões e momentos de descontração.

À aluna de iniciação científica Beatriz, pelo apoio durante dois anos de trabalho, eficiência e colaboração.

À técnica Patrícia Sper pela grande ajuda nos experimentos, principalmente com animais, além do auxílio diário no laboratório. Sou muito grata a você.

À colaboradora Marina Claro pelo apoio científico.

Ao meu pai, pelo amor e cuidado durante toda a minha vida.

À minha mãe, que embora esteja fisicamente longe, me educou e me orientou de maneira brilhante.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela valiosa oportunidade de aprimoramento profissional.

À empresa Lipid Ingredients & Technology, por gentilmente doar matérias-primas para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que direta e indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

RESUMO

BERNARDI, D.S. **Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas.** 2015. 162f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A imunização transcutânea (IT) é uma técnica promissora de vacinação, na qual a formulação contendo o antígeno é aplicada sobre a pele para induzir resposta imune. O sucesso desse tipo de imunização ocorre devido à presença de células apresentadoras de antígenos (APCs) na epiderme viável, as quais são potentes estimuladoras de linfócitos T. Porém, é necessário que o antígeno transponha a barreira imposta pelo estrato córneo e atinja a epiderme viável em concentrações adequadas para que uma resposta imune efetiva seja induzida. Neste trabalho, a influência da iontoforese, método físico que utiliza uma corrente elétrica fraca para aumentar a penetração cutânea de fármacos, foi investigada pela primeira vez na IT. Sua associação com lipossomas, para direcionar a liberação do antígeno para a epiderme viável, e com nanopartículas de prata (NPAg), para potencializar a resposta imune, também foi avaliada pela primeira vez. A ovalbumina (OVA) foi utilizada como antígeno modelo e a injeção subcutânea de OVA como controle positivo da imunização. Foram obtidos lipossomas aniônicos contendo 5 mg/mL de OVA e catiônicos contendo 0,25 mg/mL de OVA, adicionados ou não de NPAg. Os lipossomas aniônicos apresentaram tamanho médio de aproximadamente 120 nm e eficiência de encapsulação da OVA de 78,4%. Os lipossomas catiônicos apresentaram tamanho médio de aproximadamente 260 nm e eficiência de encapsulação da OVA de 83,08%. A adição das NPAg não alterou significativamente o tamanho dos lipossomas, mas alterou o potencial zeta (de -7,5 mV para -14 mV para os lipossomas aniônicos e de +41 mV para +36 mV para os lipossomas catiônicos). As microscopias de força atômica e eletrônica de transmissão (MET) confirmaram a presença de vesículas lipossomais, sendo que a TEM mostrou as NPAgs dispersas no meio aquoso externo dos lipossomas aniônicos e no meio aquoso interno dos lipossomas catiônicos. A OVA e os lipossomas se mostraram estáveis ao processo de obtenção e frente a corrente elétrica. Nos estudos de penetração cutânea *in vitro* observou-se que a encapsulação da OVA nos lipossomas direcionou sua liberação para a epiderme viável. A associação com a iontoforese aumentou 108 vezes a liberação da OVA na epiderme viável quando lipossomas aniônicos contendo NPAg foram administrados e 92 vezes quando lipossomas catiônicos contendo NPAg foram administrados. A presença das NPAg nas formulações aumentou a quantidade de OVA na epiderme viável quando a iontoforese foi utilizada, mas diminuiu sua penetração passiva. As quantidades de OVA penetradas por iontoforese anódica e catódica a partir dos lipossomas aniônicos não foram significativamente diferentes. O coeficiente de penetração da OVA na epiderme viável a partir da iontoforese dos lipossomas aniônicos foi 1,6 vezes (na ausência de NPAg) e 39 vezes (na presença de NPAg) maior do que o dos lipossomas catiônicos. Nos experimentos de imunização transcutânea *in vivo* observou-se que as quantidades de OVA que penetraram a pele por iontoforese foram suficientes para induzir resposta imune humoral semelhante a induzida pela injeção subcutânea da OVA para os lipossomas aniônicos, na presença e ausência de NPAg, e para o lipossoma catiônico apenas na presença da NPAg, sugerindo que as NPAg, na presença de baixas concentrações de OVA, funcionam como adjuvantes imunológicos. A iontoforese anódica das formulações, assim como a injeção subcutânea da OVA, não estimularam resposta imune celular significativa. A iontoforese catódica, no entanto, induziu tanto resposta humoral como celular, além de estimular a produção de INF- γ e o recrutamento de células apresentadoras de antígeno, tanto no baço como nos linfonodos inguinais. Sendo assim, a iontoforese de lipossomas contendo OVA e NPAg foi capaz de direcionar a liberação da OVA para a epiderme, induzir altos títulos de anticorpos IgG1 e ainda ativar a resposta imune celular, sendo uma estratégia promissora para a IT.

Palavras-chave: Imunização transcutânea, lipossomas, iontoforese, ovalbumina e nanopartículas metálicas.

ABSTRACT

BERNARDI, D.S. **Iontophoresis influence on transcutaneous immunization using liposomes and metal nanoparticle.** 2015. 162f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Transcutaneous immunization (TI) is a promising strategy for vaccine in which the antigen-containing formulation is applied to the skin to induce immune response. The success of this type of immunization occurs due to the presence of antigen presenting cells (APCs) in the viable epidermis, which are potent stimulator of T lymphocytes. However, the antigen should transverse the barrier imposed by the stratum corneum to reach the viable epidermis in appropriate concentrations so that an effective immune response is induced. In this work, the influence of iontophoresis, a physical method that uses a weak electrical current to increase skin penetration of drugs, was investigated for the first time in TI. Its association with liposomes, to target the antigen release to the viable epidermis, and with silver nanoparticles (NPAg), to enhance the immune response, was also evaluated for the first time. Ovalbumin (OVA) was used as a model antigen and OVA subcutaneous injection as a positive control of immunization. Anionic and cationic liposomes containing 5 mg/ml and 0.25 mg/mL of OVA, respectively, were obtained and were added or not by NPAg. Anionic liposomes had an average size of approximately 120 nm and 78,4% OVA encapsulation efficiency. Cationic liposomes had an average size of approximately 260 nm and 83,08% OVA encapsulation efficiency. The addition of NPAg did not significantly alter the size of the liposomes, but changed the zeta potential (-7.5 mV to -14 mV for anionic liposomes and +41 mV to +36 mV for cationic liposomes). The atomic force microscopy and transmission electron microscopy (TEM) confirmed the presence of liposomal vesicles; TEM showed NPAgs dispersed in the external aqueous medium of the anionic liposomes and in the internal aqueous medium of the cationic liposomes. The OVA and the liposomes were stable during the preparation process and in front of the electric current. In the *in vitro* skin penetration studies it was observed that the encapsulation of OVA into liposomes directed their release to the viable epidermis. The association with iontophoresis increased 108-fold the release of OVA in the viable epidermis when anionic liposomes containing NPAg were administered and 92-fold when cationic liposomes containing NPAg were administered. The presence of NPAg in the formulations increased the amount of OVA released in the viable epidermis when iontophoresis was applied, but decreased OVA passive penetration. The amount of OVA penetrated by anodic and cathodic iontophoresis of anionic liposomes was similar. The OVA penetration coefficient in the viable epidermis from the iontophoresis of anionic liposomes was 1.6-fold (in the absence of NPAg) and 39-fold (in the presence of NPAg) greater than the iontophoresis of cationic liposomes. In transcutaneous immunization *in vivo* experiments, it was observed that the amount of OVA that penetrated the skin by iontophoresis was sufficient to induce similar humoral immune response than that induced by subcutaneous injection of OVA when anionic liposomes, in the presence and absence of NPAg, and cationic liposome, only in the presence of NPAg, were administered. These results suggest that NPAg in the presence of low concentrations of OVA acted as immunological adjuvants. Although induced humoral immune response; anodal iontophoresis of the formulations as well as subcutaneous injection of OVA did not stimulate significant cellular immune response. Cathodic iontophoresis, on the other hand, induced both humoral and cellular immune response, as well as stimulating the production of IFN- γ and the recruitment of antigen presenting cells, both in spleen and in inguinal lymph nodes. Therefore, iontophoresis of liposomes containing OVA and NPAg was able to target the release of OVA to the epidermis, induce high titers of IgG1 and activate the cellular immune response, being a promising strategy for TI.

Key words: Transcutaneous immunization, liposome, iontophoresis, ovalbumin, metallic nanoparticle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação do processo de IT (Adaptado de HUANG, 2007).....	6
Figura 2.	Representação de um lipossoma unilamelar à esquerda e de uma bicamada lipídica à direita (Bozzuto; Molinari, 2015).....	7
Figura 3.	Representação esquemática do transporte iontoforético. Fármacos carregados positivamente (D^+) migram do ânodo, já fármacos carregados negativamente ($-$) migram do cátodo. As setas, vermelha e azul, representam o mecanismo de eletromigração anódica e catódica, respectivamente. A seta roxa representa o mecanismo de eletrosmose (Adaptado de ROUSTIT, BLAISE, CRACOWSKI, 2013).....	18
Figura 4.	Preparo do lipossoma por hidratação do filme lipídico (Adaptado de LASIC, 1993).....	31
Figura 5.	Ilustração da unidade de eletroforese em gel. Fonte: http://www.exonbiotec.com.br/produtos/item/76/cuba_de_eletroforese_mni_ve	34
Figura 6.	Esquema do microscópio de força atômica (RODRIGUES, 2003).....	35
Figura 7.	Ilustração da medida da resistividade elétrica da pele (R) (HUBER, 2013).....	37
Figura 8.	Representação esquemática dos grupos de animais utilizados nos experimentos de imunização <i>in vivo</i>	42
Figura 9.	Fotografia representativa da imunização <i>in vivo</i> com a aplicação da iontoforese.....	44

Figura 10.	Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução de OVA a 250 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato, pH 7,4.....	49
Figura 11.	Representação gráfica da curva analítica de uma solução de OVA em tampão fosfato na faixa de concentração de 100 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ ($\lambda_{\text{MÁX}} = 280 \text{ nm}$).....	50
Figura 12.	Espectro de absorção do fosfolipídio PC na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizado em clorofórmio (A); espectro de absorção do fosfolipídio DOPE na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizado em clorofórmio (B); Espectro de absorção da mistura dos fosfolipídios DOPE e PC na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizada em clorofórmio (C).....	51
Figura 13.	Distribuição de tamanho das dispersões tratadas com Triton-X (A) lipossomas contendo OVA, (B) OVA a 5 mg/mL em tampão fosfato.....	54
Figura 14.	Distribuição de tamanho e PDI da dispersão de NPAG (A) e espectro de absorção UV/Vis da NPAG (B).....	57
Figura 15.	Eletroforese gel da OVA em solução e incorporada aos lipossomas aniônicos.....	58
Figura 16.	Eletroforese gel da OVA em solução e incorporada aos lipossomas catiônicos. Coluna 1: substância padrão, com PM conhecidos; colunas 2 e 3: lipossoma contendo 0,25 mg/mL OVA, colunas 4 e 5: lipossoma contendo 0,1 mg/mL de OVA, colunas 6 e 7: lipossomas contendo 0,25 mg/mL OVA e NPAG, colunas 8 e 9: solução salina de OVA a 0,1 mg/mL	59
Figura 17.	Imagem de AFM do lipossoma aniônico.....	60
Figura 18.	Imagens de AFM da dispersão de NPAG (A) e do lipossoma aniônico contendo NPAG (B).....	60

Figura 19.	Imagem do lipossoma catiônico gerada através do AFM: (A) lipossoma catiônico e (B) lipossoma catiônico contendo NPAg (B).....	61
Figura 20.	Imagem de AFM das características viscoelásticas dos lipossomas. (A) campo escolhido para o estudo da propriedade viscoelástica, (B) detalhes da amostra.....	62
Figura 21.	Imagem dos lipossomas aniônicos gerada pelo microscópio eletrônico de transmissão; aumento de 100 K (A) e aumento de 200 K (B).....	62
Figura 22.	Imagem dos lipossomas aniônicos adicionados de NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 100K (A) e aumento de 200 K (B).....	63
Figura 23.	Imagem dos lipossomas catiônicos gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 100K (A e B).....	63
Figura 24.	Imagem dos lipossomas catiônicos adicionados de NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 100 K (A) e aumento de 200 K (B).....	64
Figura 25.	Imagem da dispersão dos lipossomas aniônicos e NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 50 K (A) e aumento de 100 K (B). As setas apontam para as NPAg.....	65
Figura 26.	Imagem da dispersão de lipossomas catiônicos adicionados de NPAg gerada pela microscopia eletrônico de transmissão; aumento de 50K (A) e aumento de 100K (B). As setas apontam para as NPAg.....	65
Figura 27.	Representação gráfica da curva analítica da OVA na presença da pele na faixa de concentração de 0,5 a 4 ng/mL a 450 nm.....	69
Figura 28.	OVA recuperada do EC e da epiderme viável a partir da dispersão de	

- OVA em tampão fosfato pH 7,4 a 5 mg/mL. Os asteriscos (*) referem-se a diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$) e EC refere-se ao estrato córneo..... 70
- Figura 29.** OVA permeada passivamente e por iontoforese no (A) EC e (B) epiderme viável a partir dos lipossomas aniônicos contendo OVA a 5mg/mL na ausência e presença de NPAg. Os asteriscos (*) referem-se a diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$) e EC refere-se ao estrato córneo..... 71
- Figura 30.** OVA penetrada passivamente e por iontoforese após administração tópica dos lipossomas catiônicos contendo OVA a 0,25 mg/mL na presença e ausência de NPAg. (A) EC e (B) epiderme viável. Os asteriscos (*) referem-se a diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$) e EC refere-se ao estrato córneo..... 72
- Figura 31.** Título de anticorpo IgG1 anti-OVA produzido após tratamento com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos. (A) Após uma imunização. (B) Após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n=5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P<0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$) em relação ao controle positivo (SC OVA). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese..... 74
- Figura 32.** Título de anticorpo IgG2a anti-OVA produzido após tratamento com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos. (A) Após uma imunização. (B) Após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n=5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple*

comparison test) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese..... 75

Figura 33. Título de anticorpo IgM anti-OVA produzidos após tratamento com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos. (A) Após uma imunização. (B) Após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese..... 76

Figura 34. Título de anticorpo IgG1 anti-OVA produzido após tratamento com os lipossomas catiônicos e com iontoforese da OVA livre a 100 $\mu\text{g/mL}$, após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese..... 77

Figura 35. Título de anticorpo IgG2a anti-OVA produzido após tratamento com os lipossomas catiônicos e com iontoforese da OVA livre a 100 $\mu\text{g/mL}$, após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple*

comparison test) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese..... 78

Figura 36. Porcentagem das células que expressam CD3 ativadas pelo marcador CD45 (A) e CD44 (B) após uma imunização com OVA livre e com lipossomas aniônicos. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos..... 79

Figura 37. Porcentagem das células que expressam CD3 após administração passiva e por iontoforese catódica com a OVA livre e os lipossomas aniônicos: CD3 total (ativada ou não) (A), células que expressam CD3 e não estão ativadas ($CD45^-$) (B), células que expressam CD3 e estão ativadas ($CD45^+$) (C) e linfócitos T ativados, $CD45^+$, na região *low* (D). Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos..... 80

Figura 38. Porcentagem das células que expressam $CD4^+$ ativada, $CD45^+$, na região *high* após tratamento com a OVA livre e os lipossomas aniônicos passivamente e por iontoforese catódica. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos..... 81

Figura 39. Porcentagem das células B marcadas com CD19 ativadas na região *high* após tratamento com OVA livre e com os lipossomas aniônicos na presença ou ausência da iontoforese catódica. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se

	à diferença estatística entre os grupos.....	82
Figura 40.	Expressão de linfócitos T CD3 ativados na região de alta intensidade de fluorescência após a segunda imunização passiva e por iontoforese anódica com a OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos: ativação CD44 (A) e CD45 (B). Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.....	83
Figura 41.	Porcentagem das células B marcadas com CD19 ativadas na região <i>high</i> após tratamento passivo e por iontoforese anódica com OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva.....	84
Figura 42.	Expressão de linfócitos T CD3 com o marcador de ativação CD45 na região de alta intensidade de fluorescência após a segunda imunização por iontoforese catódica com a OVA livre a 100 μ g/mL e passiva e por iontoforese anódica da OVA encapsulada nos lipossomas catiônicos. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva...	85
Figura 43.	Decaimento da fluorescência determinado por citometria de fluxo após iontoforese anódica e injeção subcutânea de lipossomas aniônicos, utilizando o software FCS Express V3, para os grupos de animais estudados e estimulados com OVA (10,0; 100,0 e 500,0 μ g/mL) e ConA...	86
Figura 44.	Proliferação de células CD4 nos diferentes grupos de animais tratados com iontoforese anódica e injeção subcutânea de lipossomas aniônicos e estimulados com OVA (10, 100 e 500 μ g/mL) e ConA. * (P<0,05) One-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.....	87

- Figura 45.** Título de anticorpo IgG1 anti-OVA nos animais tratados por injeção subcutânea e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo ou não OVA após duas imunizações, realizados durante o experimento de OVA *recall*. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos..... 88
- Figura 46.** Determinação de IFN- γ nos animais tratados por injeção subcutânea e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo ou não OVA. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com ConA, (B) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 100 $\mu\text{g/mL}$ e (C) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 500 $\mu\text{g/mL}$. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos 89
- Figura 47.** Determinação de IL-2 nos animais tratados por injeção subcutânea e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo ou não OVA. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com ConA, (B) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 100 $\mu\text{g/mL}$ e (C) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 500 $\mu\text{g/mL}$. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos 89
- Figura 48.** Determinação de IFN- γ nos animais tratados passivamente e por iontoforese catódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com OVA 100 $\mu\text{g/mL}$ e (B) quantificação em cultura de células estimuladas com anti-CD3. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos..... 90
- Figura 49.** Quantidade de IL-2 nos animais tratados passivamente e por iontoforese catódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos.. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com OVA 100 $\mu\text{g/mL}$ e (B) quantificação em cultura de células estimuladas com anti-CD3. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos..... 91

- Figura 50.** Análise por citometria de fluxo da janela (gate) de células apresentadoras de antígenos estimuladas após tratamento com iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos marcados com OVA FITC. (A) APCs quantificadas no baço, (B) APCs quantificadas no linfonodo. O quadrante preto delimita a população de células dendríticas analisada..... 92
- Figura 51.** Porcentagem de células dendríticas fluorescentes no baço dos animais tratados com iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos marcados com OVA FITC..... 93
- Figura 52.** Porcentagem de células dendríticas fluorescentes dos linfonodos inguinais dos animais tratados com iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos marcados com OVA FITC..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição dos lipossomas aniônicos utilizando diferentes composições de lipídios.....	31
Tabela 2.	Composição dos lipossomas catiônicos utilizando diferentes composições de lipídios.....	32
Tabela 3.	Análise da precisão e exatidão intra dia.....	50
Tabela 4.	Análise da precisão e exatidão inter dia.....	50
Tabela 5.	Parâmetros obtidos por espectrofotometria UV/Vis ($\lambda = 280$ nm) para a análise da sensibilidade do método analítico para a OVA.....	51
Tabela 6.	Tamanho médio e PDI dos lipossomas em função do tempo de dispersão nos equipamentos ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão.....	52
Tabela 7.	Tamanho médio, PDI e potencial zeta das formulações de lipossomas aniônicos.....	54
Tabela 8.	Tamanho médio, PDI e potencial zeta das formulações de lipossomas catiônicos.....	55
Tabela 9.	Tamanho, PDI e potencial zeta das dispersões utilizadas nos estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	56
Tabela 10.	Tamanho, Intensidade, PDI e potencial zeta de lipossomas contendo OVA acrescidos ou não de NPAg.....	57
Tabela 11.	Quantidade de OVA encapsulada nos lipossomas aniônicos e catiônicos adicionados ou não de NPAg.....	58

Tabela 12.	Estabilidade física dos lipossomas aniônicos, na ausência e presença de NPAg, a temperatura ambiente em função do tempo.....	66
Tabela 13.	Estabilidade física dos lipossomas catiônicos, na ausência e presença de NPAg, a temperatura ambiente em função do tempo.....	66
Tabela 14.	Estabilidade física dos lipossomas aniônicos, na ausência e presença de NPAg, frente a corrente elétrica de 0,5 mA.....	68
Tabela 15.	Estabilidade física dos lipossomas catiônicos, na ausência e presença de NPAg, frente a corrente elétrica de 0,5 mA.....	68
Tabela 16.	Coeficiente de penetração da OVA na epiderme viável a partir das formulações administradas por iontoforese.....	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
CL	Células de Langerhans
CD	Células Dendríticas
CDD	Células Dendríticas Dérmicas
EC	Estrato Córneo
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IM	Intra Muscular
IT	Imunização Transcutânea
Lip	Lipossoma
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NaCl	Cloreto de Sódio
NPAg	Nanopartícula de Prata
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato de sódio
SBF	Soro bovino fetal
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TLRs	Receptores <i>Toll Like</i>
UV/Vis	Ultravioleta Visível

Sumário

Resumo	i
Abstract.....	II
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Imunização transcutânea.....	3
2.2. Lipossomas	7
2.2.1. Lipossomas e vacinas.....	13
2.3. Métodos Físicos e Vacinação	15
2.3.1. Iontoforese.....	17
2.4. Adjuvantes imunológicos	20
2.4.1. Partículas metálicas como adjuvantes imunológicos.....	23
3. OBJETIVO	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Material.....	27
4.2. Pele	27
4.3. Animais de laboratório	27
4.4. Padronização de metodologia analítica para quantificação da OVA por espectrofotometria no UV/Vis.....	27
4.4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{MÁX}$) da OVA no UV/Vis.....	28
4.4.2. Validação da metodologia analítica.....	28
4.5. Obtenção das dispersões lipossomais	30
4.5.1. Preparo geral dos lipossomas.....	30
4.5.2. Padronização do tempo de homogeneização dos lipossomas.....	32
4.5.3. Incorporação das NPAg às dispersões lipossomais.....	32
4.6. Caracterização dos lipossomas	33
4.6.1. Tamanho da partícula e índice de polidispersividade.....	33

4.6.2.	Potencial zeta.....	33
4.6.3.	Determinação do valor de pH.....	33
4.6.4.	Eficiência de encapsulação (EE%).....	33
4.6.5.	Eletroforese em gel.....	34
4.6.6.	Microscopia de força atômica (AFM).....	35
4.6.7.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	36
4.7.	Estabilidade física dos lipossomas	36
4.7.1.	Estabilidade dos lipossomas frente à aplicação da corrente elétrica.....	36
4.8.	Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea.....	37
4.8.1.	Medida da resistividade elétrica da pele (R)	37
4.8.2.	Recuperação da OVA da pele	37
4.8.3.	Preparo dos eletrodos usados na iontoforese.....	38
4.8.4.	Iontoforese <i>in vitro</i>	38
4.8.4.1.	Determinação da OVA retida na pele.....	39
4.8.4.2.	“Tape stripping”.....	39
4.9.	Quantificação da OVA por ELISA.....	40
4.9.1.	Curva de calibração da OVA em pele.....	40
4.10.	Experimentos de imunização <i>in vivo</i>	41
4.10.1.	Imunização dos camundongos BALB/c e avaliação da resposta imune	41
4.10.1.1.	Tratamento.....	43
4.10.1.2.	Dosagem de anticorpos anti-OVA.....	44
4.10.1.3.	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	45
4.10.2.	Experimentos de reestimulação (OVA <i>recall</i>)	45
4.10.2.1.	Determinação de citocinas	46
4.10.3.	Estudo de recrutamento de células apresentadoras de antígenos	47
4.11.	Análise estatística	47
5.	RESULTADOS	49
5.1.	Padronização de metodologia analítica para quantificação da OVA por espectrofotometria no UV/Vis	49
5.1.1.	Determinação do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{MÁX}$) da OVA no UV/Vis.....	49
5.1.2.	Validação da metodologia analítica.....	49
5.2.	Obtenção de lipossomas contendo OVA	52

5.2.1.	Nanopartículas metálicas de Prata (NPAg).....	56
5.2.2.	Eficiência de encapsulação (EE%).....	58
5.2.3.	Eletroforese gel	58
5.2.4.	Microscopia de força atômica (AFM).....	59
5.2.5.	Microscopia eletrônica de transmissão	62
5.3.	Estabilidade física dos lipossomas	65
5.4.	Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea.....	69
5.5.	Experimentos de imunização <i>in vivo</i>	73
5.5.1.	Dosagem de anticorpos anti-OVA	73
5.5.2.	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	79
5.5.3.	Experimentos de reestimulação (OVA <i>recall</i>).....	85
5.5.4.	Determinação de citocinas.....	88
5.5.5.	Estudo de recrutamento de células apresentadoras de antígenos.....	91
6.	DISCUSSÃO	95
7.	CONCLUSÃO.....	111
8.	REFERÊNCIAS	113
9.	ANEXOS.....	136

1. INTRODUÇÃO

As vacinas são preparações biológicas que melhoram a imunidade a determinada doença e são consideradas uma das realizações mais importantes da medicina (HAN, 2015). Várias doenças, como sarampo, rubéola, coqueluche, tétano e febre amarela estão hoje sob controle graças a elas. A maioria das vacinas convencionais, porém, são administradas de forma invasiva, com agulhas, causando problemas como dor, lesões, transmissão de doenças e exigência de pessoal treinado para aplicação. As vacinas são também muitas vezes instáveis, dificultando seu transporte e armazenamento. O desejo de eliminar o uso de agulhas e a necessidade de se obter vacinas mais estáveis motiva o desenvolvimento de novas formulações e estratégias de vacinação. Desta forma, grande atenção tem sido dada à imunização transcutânea (IT). Na IT, a vacina é administrada na pele, de forma não-invasiva, a partir de uma formulação estável. Para que a resposta imune seja induzida, no entanto, o antígeno precisa atravessar o estrato córneo (EC), principal barreira da pele à penetração de substâncias, e atingir as camadas viáveis da pele. São nessas camadas que estão presentes as células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs têm um papel importante nos primeiros passos da resposta imune: elas capturam os antígenos, migram para os gânglios linfáticos periféricos, processam o mesmo e o apresentam para as células T *naive*, as quais dão início à resposta imune celular (IGYÁRTÓ; KAPLAN, 2013).

Para contornar a barreira imposta pelo EC na IT, várias estratégias têm sido utilizadas. Dentre elas estão o uso de sistemas carreadores coloidais, como os lipossomas (TORCHILIN, 2005, GUO *et al.*, 2013, MADNI *et al.*, 2014) e de métodos físicos, como a eletroporação (JADOUL; BOUWSTRA; PREAT, 1999, MATSUO *et al.*, 2013). A adição de adjuvantes às formulações que contém o antígeno também é utilizada na tentativa de induzir e aumentar as respostas imunológicas inatas e/ou adaptativas.

Os lipossomas são vesículas nanométricas compostas por fosfolipídeos que podem proteger os antígenos contra a degradação e ajudá-los a transpor a função de barreira imposta pelo EC, podendo veicular tanto compostos hidrofílicos como lipofílicos, proteínas e outras macromoléculas (ESSA *et al.*, 2002). Para aumentar a estabilidade física dos lipossomas, nanopartículas metálicas vem sendo adicionadas às formulações lipossomais (PORNATTANANANGKUL *et al.*, 2010). Além disso, tanto os lipossomas como as nanopartículas metálicas são estudados como adjuvantes imunológicos (JAZAYERI *et al.*, 2012, XU *et al.*, 2013, CHOPRA; CEVC, 2014), mas nunca tiveram seu potencial avaliado em conjunto em uma formulação para a IT.

A eletroporação é o método físico mais estudado para a IT. Ela consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem na pele, que promovem a formação transitória de poros aquosos na bicamada lipídica do EC, permitindo que macromoléculas difundam através desses poros. Apesar da eletroporação permeabilizar a pele facilitando o transporte de antígenos, este método pode causar danos celulares irreversíveis e promover a entrada de íons indesejados, alterando algumas funções das células (EDWARDS *et al.*, 1995). A aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, como a iontoforese, pode ser uma alternativa à eletroporação. A iontoforese é a técnica empregada e estudada com maior frequência para aumentar a permeação cutânea de fármacos (BANGA; CHIEN, 1988, JADOUL; BOUWSTRA; PREAT, 1999, KALIA *et al.*, 2004, GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008), mas vem sendo muito pouco explorada na IT. Estima-se que seja possível, alterando parâmetros elétricos e características da formulação submetida à iontoforese, direcionar a liberação de antígenos para as camadas da pele onde são encontradas as APCs. Como os lipossomas são sistemas de liberação que tem afinidade pela pele, a iontoforese desses sistemas parece ser uma estratégia promissora para a entrega de antígenos na pele. A associação de nanopartículas metálicas à formulação submetida à iontoforese, além de aumentar a estabilidade dos lipossomas, devem aumentar a eficiência da corrente elétrica, ou seja, aumentar a condutividade elétrica, e facilitar tanto a penetração do antígeno encapsulado nos lipossomas quanto a penetração das próprias nanopartículas metálicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da iontoforese na resposta imune resultante da IT com lipossomas estabilizados com nanopartículas metálicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Imunização transcutânea

A maioria das vacinas atuais utiliza as vias intramuscular, subcutânea, intranasal, intradérmica, ou oral para a veiculação de antígenos. Com exceção das vias intranasal e oral tem-se a necessidade do uso de agulhas para a administração dos mesmos. As técnicas baseadas no uso de agulhas embora promovam uma resposta imune efetiva, apresentam desvantagens relacionadas à segurança e adesão do paciente (KERSTEN; HIRSCHBERG, 2007). Órgãos como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Aliança Global para Vacinas e Imunização e o Centro de Controle de Doenças e Prevenção, atuam a favor de estratégias de vacinação que não fazem o uso de agulhas por diversas razões. A preocupação com o risco de transmissão de doenças infecciosas entre os pacientes, ocasionado devido à reutilização de agulhas, ou entre os profissionais de saúde e os pacientes, devido a contaminações acidentais, merece destaque. A OMS estima que são administradas cerca de 12 bilhões de injeções anualmente ao redor do mundo, sendo aproximadamente 600 milhões de aplicações de vacinas injetáveis (KARANDE; MITRAGOTRI, 2010).

A administração de vacinas orais é uma técnica de vacinação não invasiva, porém apresentam obstáculos intransponíveis, como a necessidade de administração de altas doses de antígenos, a restrição ao uso de muitos adjuvantes necessários à formulação, bem como a falta de estabilidade das vacinas devido às condições adversas do trato gastrointestinal (JUNG; PATZELT, 2009, AZIZI *et al.*, 2010, SEID JR *et al.*, 2012). Também as vacinas aplicadas pela via nasal podem acarretar efeitos colaterais relevantes, tais como a paralisia de Bell, danos nos nervos olfatórios e no epitélio nasal (AZIZI *et al.*, 2010). Já nos músculos existe um número limitado de células apresentados de antígenos (APCs) as quais apresentam os antígenos aos linfócitos T *naïves*, sendo esses os iniciadores da resposta imune adaptativa. Desta forma, vacinas administradas pela via intramuscular ou subcutânea não direcionam a liberação de antígenos às APCs. . Em contraste, a pele possui uma rica rede imunológica e é considerada uma via promissora para a administração de antígenos.

A estrutura mais externa da pele é composta por corneócitos, que são células anucleadas e queratinizadas que compõe o estrato córneo (EC) (NESTLE *et al.*, 2009). Logo abaixo deste, em direção ao interior do organismo está a epiderme viável. Esta é formada pelo estrato granuloso contendo junções denominadas *tight junctions*, seguido do estrato espinhoso e, finalmente, da camada basal ligada a um complexo de membrana basal. Além dela está a derme, estrutura mais interna da pele.

O EC e as *tight junctions* asseguram uma barreira física eficaz contra a entrada de agentes patogênicos do ambiente para o organismo. Já na epiderme existem vários tipos de células especializadas que tem papéis distintos na imunidade. Dentre elas estão as células de Langerhans, que são células dendríticas epidérmicas e tem um importante papel na IT. Elas estão distribuídas por toda a epiderme, representam aproximadamente 3 a 5 % das células totais desse tecido e tem sido relatada como sendo reguladores da tolerância e imunidade (ROMANI; CLAUSEN; STOITZNER, 2010). As células de Langerhans são APCs e podem ser as responsáveis por iniciar a resposta imune. Também estão presentes na epiderme os queratinócitos e as células T de memória, também importantes na IT, as células de Merkel, que estão à serviço do sistema nervoso e os melanócitos, que são responsáveis pela proteção contra danos provocados pela luz ultravioleta (CLARK, *et al.*, 2006, MARICICH *et al.*, 2009, GEBHARDT, *et al.*, 2009, TOULON, *et al.*, 2009). Os queratinócitos têm um papel fundamental na imunidade inata, expressando muitos receptores de reconhecimento de padrões, incluindo os receptores *Toll-like* (TLRs) que reconhecem uma grande variedade de componentes de patógenos (BROWN; MCLEAN, 2012, KUO *et al.*, 2013). Eles são responsáveis por cerca de 90% da população total de células da epiderme, funcionando como transdutores de sinais básicos e em caso de perigo produzem uma vasta gama de citocinas, quimiocinas e antimicrobianos peptídicos (LI *et al.*, 2011-A, SANFORD; GALLO, 2013).

A derme não possui tantas células quanto a epiderme. Ela é composta principalmente por fibras de elastina e colágeno dispersos em uma matriz extracelular produzida em grande parte por fibroblastos. Vasos sanguíneos e linfáticos estão espalhados por toda a derme, assim como os nervos que acessam a derme e a epiderme. Os vasos linfáticos drenam a partir da derme papilar (em contato com a epiderme) para a derme reticular e hipoderme carregando os linfonodos drenantes para acessar eventualmente os gânglios linfáticos. Antígenos que chegam a derme são conduzidos aos linfonodos drenantes pelas células dendríticas. As células dendríticas são, portanto, as APCs da derme. Somando-se às células de Langerhans, as células dendríticas dérmicas são consideradas como sendo as reguladoras da resposta imune adaptativa cutânea (DUPASQUIER *et al.*, 2004) Outros tipos de células imunologicamente competentes importantes na derme são os mastócitos, os macrófagos, as células linfóides inatas e as células T $\gamma\delta$ e células T $\alpha\beta$ (HEATH; CARBONE, 2013).

O sistema imune cutâneo já foi descrito de várias maneiras. Streilein foi o primeiro a propor que a pele estava associada ao tecido linfoide e defendeu a existência de um sistema integrado de vigilância imunológica exclusivamente para a pele (STREILEIN, 1983). Ele

introduziu a ideia, aceita até hoje, de que diferentes células do sistema imune circulam continuamente a partir da pele em direção aos linfonodos drenantes e à circulação sanguínea periférica para proporcionar ótima “vigilância” dos tecidos periféricos. Streilein também foi o primeiro a descrever a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) nas células de Langerhans, com capacidade de processamento e apresentação de antígenos endógenos e exógenos (STREILEIN; LONSBERRY; BERGSTRESSER, 1982). Boss e colegas mais tarde modernizaram a interpretação da imunologia cutânea por introduzir o conceito do sistema imune da pele (BOS; KAPSENBERG, 1993). Essa descrição é usada até hoje (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004, NESTLE *et al.* 2009).

Em condições não inflamatórias, a maioria das células que compõe o sistema imune da pele é imatura, o que significa que elas possuem uma forte capacidade endocítica. Em resposta à vacinação, o sistema imune da pele utiliza mecanismos complexos que montam uma resposta imune efetora que permite a proteção contra doenças. Estes mecanismos podem ser divididos em 7 etapas principais: (1) reconhecimento e captura do antígeno presente na vacina pelas APCs residentes na pele ou pelo recrutamento de células do sistema imune inato (micro ambiente inflamatório), (2) ativação das APCs, (3) difusão passiva ou transporte do antígeno para os órgãos linfoides secundários drenantes da pele (linfonodos drenantes), (4) processamento e apresentação do antígeno pelas APCs ativadas para as células T CD4 e CD8 imaturas ou para as células B foliculares *naive*, (5) ativação de células T CD4 e CD8 específicas para o antígeno, expansão clonal, bem como ativação de células B específicas dentro dos centros germinativos, (6) migração de células T CD4 efectoras e CD8 (linfócitos T citotóxicos) e de células B (plasmócitos que secretam anticorpos) para a região de vacinação e eliminação do antígeno proveniente da vacina, (7) geração de um “pool” de células T e B de memória nos linfonodos drenantes, na medula óssea e na periferia (pele e mucosa). (SAEKI *et al.*, 1999, BAL *et al.*, 2010, COMBADIERE; LIARD, 2011). Um esquema geral do processo de IT é mostrado na Figura 1.

Figura 1. Representação do processo de IT (Adaptado de HUANG, 2007)

Vários estudos mostram que a IT pode induzir uma resposta imunológica primária e secundária de forma similar às outras vias de vacinação (SCHARTON-KERSTEN *et al.*, 2000, HAMMOND; TSONIS; SELLINS, 2000). Mais ainda, alguns estudos indicam que a resposta imune gerada pela IT, levando em consideração a produção de IgG, é cerca de 10 vezes mais efetiva do que a imunização por injeção subcutânea da mesma dose da vacina (TEZEL; MITRAGOTRI, 2003).

Como demonstrado nos trabalhos de Guo e colaboradores (2013) e Quan e colaboradores (2010), a IT gera uma maior resposta via Th2, a qual está relacionada com a produção de anticorpos IgG1. Esse tipo de resposta imune é essencial para a proteção contra patógenos extracelulares, como por exemplo, a maioria das bactérias. Já a via Th1 é especializada contra patógenos intracelulares, como algumas espécies de *mycobacterium*, vírus influenza, dentre outros. Dessa maneira, dependendo do alvo da vacina, torna-se necessário um balanço Th1/Th2, que pode ser feito com a adição de adjuvantes para se obter uma formulação que induza uma maior resposta via Th1 por IT (KOUTSONANOS *et al.*, 2009).

Os estudos pioneiros de IT foram descritos em 1998 e envolveram a aplicação na pele de um *patch* contendo uma toxina (cólera) (GLENN *et al.*, 1998, GLENN; SCHARTON-KERSTEN; ALVING, 1999). Atualmente, uma vacina atenuada registrada como Tetragrip® (gripe sazonal) está em teste clínico, fase Ia. Estudos realizados tanto em indivíduos saudáveis

como em HIV soropositivos mostrou uma maior indução de resposta CD8 pela IT do que pela administração intramuscular (COMBADIERE; LIARD, 2011). Recentemente, Matsuo e colaboradores (2014) mostraram que a administração tópica de β amiloide induzia uma resposta imune promissora contra a doença de Alzheimer.

Ao mesmo tempo em que a pele é um órgão interessante para a veiculação de vacinas, a função de barreira imposta por sua camada mais externa, o EC, é um fator limitante para a aplicação tópica de antígenos (JUNG *et al*, 2009). Como forma de extrapolar esta barreira, lipossomas e o emprego dos métodos físicos para aumentar a permeabilidade da pele vêm sendo estudados.

2.2. Lipossomas

Os lipossomas são sistemas formados por vesículas lipídicas, no qual um núcleo aquoso bem definido está presente dentro da camada lipídica (Figura 2).

Figura 2. Representação de um lipossoma unilamelar à esquerda e de uma bicamada lipídica à direita (Bozzuto; Molinari, 2015).

Em 1964, o pesquisador Alec D. Bangham e colaboradores reportaram a formação espontânea de vesículas lipídicas, que foram descritas como “mesofases esmélicas” e denominadas “Bangasomes” em homenagem ao seu descobridor (BANGHAM; HORNE, 1964). Em 1968, Weissmann adaptou o termo para “lipossomas”, uma analogia aos lisossomas. Inicialmente os lipossomas foram usados como modelos de membranas em estudos biológicos, no entanto a semelhança dos lipossomas com as estruturas celulares persuadiram pesquisadores a investigá-los como uma ferramenta de transporte de fármacos para dentro do corpo humano. Em 1971 foi publicada a primeira encapsulação de um agente

terapêutico nessas vesículas, a enzima amiloglucosidase em associação com albumina para terapia de reposição enzimática (GREGORIADIS; LEATHWOOD; RYMAN, 1971). Aproximadamente 50 anos após a descoberta dos lipossomas, o FDA aprovou 13 produtos que os continham para uso em humanos (Quadro 1). Atualmente, muitos outros produtos a base de lipossomas estão em diferentes fases de estudos clínicos (MADNI *et al.*, 2014).

Quadro 1. Formulações baseadas em lipossomas disponíveis para aplicação clínica (Adaptado de Madni *et al.*, 2014)

Produto	Substância ativa	Indicação
Ambisome	Anfotericina B	Infecção fúngica
Abelcet	Anfotericina B	Infecção fúngica
Amphotec	Anfotericina B	Infecção fúngica
Daunoxome	Daunorrubicina	Leucemia
Doxil	Doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e mama
Lipo-dox	Doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e mama
Marqibo	Vincristine	Leucemia linfoblástica aguda
Myocet	Doxorrubicina	Câncer de mama metastático
Visudyne	Verteporfina	Terapia fotodinâmica
Depocyt	Citarabina	Meningite neoplásica e linfomatosa
DepoDur	Morfina	Dor
Epaxal	Inativação do vírus da hepatite A	Hepatite A
Inflexal V	Hemaglutinina inativa do vírus influenza	Influenza

Os lipossomas preparados a partir de materiais naturais ou seus derivados são biocompatíveis e biodegradáveis (ROOIJEN; NIEUWMEGEN, 1980). São capazes de veicular substâncias hidrofílicas em seu núcleo aquoso e aumentar a penetração das mesmas através de membranas lipofílicas, enquanto que substâncias lipofílicas são veiculadas na bicamada lipídica e tem sua solubilidade aumentada nos fluidos corporais aquosos (RAHMAN *et al.*, 1974). Substâncias encapsuladas em lipossomas podem ter ainda sua

estabilidade garantida devido a maior proteção conferida pela vesícula contra a degradação enzimática (CHAIZE *et al.*, 2004). Também são considerados sistemas de liberação versáteis, pois características como tamanho, carga e superfície dos lipossomas podem ser facilmente modificadas através da adição de substâncias à mistura lipídica durante o preparo e/ou por variação no método de obtenção, o que pode auxiliar no aumento de sua estabilidade e da biodisponibilidade da substância encapsulada (TORCHILIN, 2005).

Os lipossomas são geralmente classificados de acordo com o seu tamanho, número de bicamadas e composição de lipídios. As vesículas unilamelares pequenas (SUVs) apresentam tamanho na faixa de 20-40 nm, enquanto as vesículas unilamelares médias (MUVs) possuem de 40-80 nm e as vesículas unilamelares grandes (LUVs) são maiores do que 100 nm. Vesículas multilamelares (MLVs) são lipossomas com várias bicamadas lipídicas, sendo pequeno o espaço entre cada camada (GHAFAR *et al.*, 2014).

Alguns exemplos de fosfolipídios usados no preparo de lipossomas estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Exemplos de fosfolipídios usados no preparo de lipossomas (Adaptada de GRAFFAR *et al.*, 2014).

Nome dos fosfolipídios	Cabeça (R ₁)	Cauda (R ₂ , R ₃)
Dioleilfosfatidilcolina (DOPC)	Colina CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Oleil CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ C(O)
Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)	Colina CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Miristoil CH ₃ (CH ₂) ₁₂ C(O)
Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	Colina CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Palmitoil CH ₃ (CH ₂) ₁₄ C(O)
Distearoilfosfatidilcolina (DSPC)	Colina CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Stearoil CH ₃ (CH ₂) ₁₆ C(O)
Dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)	Etanolamina CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Oleil CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ C(O)
Distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)	Etanolamina CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Stearoil CH ₃ (CH ₂) ₁₆ C(O)
Dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG)	Glicerol CH ₂ CHOHCH ₂ OH	Miristoil CH ₃ (CH ₂) ₁₂ C(O)
Dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)	Glicerol CH ₂ CHOHCH ₂ OH	Palmitoil CH ₃ (CH ₂) ₁₄ C(O)
Dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS)	Serina CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	Palmitoil CH ₃ (CH ₂) ₁₄ C(O)
Distearoilfosfatidilserina (DSPS)	Serina CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	Stearoil CH ₃ (CH ₂) ₁₆ C(O)

Apesar das inúmeras vantagens terapêuticas apresentadas pelos lipossomas, sua disponibilidade no mercado é comprometida pela sua instabilidade físico-química em dispersões aquosas, como por exemplo, hidrólise e oxidação dos fosfolipídios, fuga da substância encapsulada e agregação das vesículas durante o tempo de armazenamento. Uma forma de contornar essa instabilidade é empregar o processo de liofilização, o qual remove a

água do sistema gerando um produto sólido. Assim, o armazenamento dos lipossomas na forma liofilizada representa uma alternativa viável, porém deve ser incluído na formulação um agente crioprotetor para evitar a fusão das membranas desidratadas e a consequente fuga da substância encapsulada no momento da hidratação. A liofilização é o principal processo empregado para secagem de proteínas e peptídeos, os quais também são fisicamente e/ou quimicamente instáveis em solução aquosa (MOHAMMED *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2010).

Com relação aos métodos de preparo, os lipossomas podem ser produzidos por hidratação do filme lipídico, injeção etanólica, evaporação da fase e técnicas de homogeneização, como cisalhamento e pressão. No método de produção por hidratação do filme lipídico, os fosfolipídios são dissolvidos em um solvente orgânico seguidos por secagem para formar um filme lipídico fino. Para formar as vesículas lipossomais esse filme lipídico é hidratado usando uma solução aquosa do fármaco sob agitação (RIAZ, 1996). Esse método apresenta algumas vantagens sobre os demais, pois pode ser usado para todos os tipos de misturas lipídicas. Além disso, é de fácil preparo e permite a encapsulação de altas taxas de substâncias lipofílicas, bem como substâncias hidrofílicas, devido à alta concentração de lipídios usada (WAGNER; VORAUER-UHL, 2011). O método de injeção etanólica envolve a dissolução do lipídio em uma fase orgânica, seguida da injeção dessa solução em meio aquoso, formando os lipossomas. Esse método é simples, mas alguns lipídios são fracamente solúveis em etanol e com isso lipossomas heterogêneos são formados quando a mistura adequada não é realizada. Já a técnica de evaporação da fase reversa, baseia-se na dissolução dos lipídios em solvente orgânico, adicionando um pequeno volume de fase aquosa. Em seguida, a solução é submetida à sonicação para produzir micelas invertidas e o solvente orgânico é removido utilizando um evaporador rotativo, obtendo assim um gel viscoso. Uma desvantagem deste método é que a substância a ser encapsulada dentro das vesículas está em contato com um solvente orgânico, por conseguinte, o processo não é adequado para substâncias como peptídeos. As técnicas de homogeneização são realizadas após a formação dos lipossomas com objetivo de uniformização das vesículas e incluem os métodos mecânicos de agitação intensa, extrusão, homogeneização sob alta pressão, ultrassom e borbulhamento de gás (MAHERANI *et al.*, 2011).

Embora muitas vias de administração de fármacos têm sido utilizadas para a veiculação de produtos à base de lipossomas, a administração parenteral é a predominante para produtos clinicamente aprovados, em particular a administração intravenosa. Outras vias que alcançaram sucesso clínico são a via ocular, transdérmica e tópica. A administração oral

não é geralmente usada para os produtos lipossomais devido a degradação no trato gastrointestinal que resulta em baixa biodisponibilidade dos fármacos veiculados. Também, a liberação para o cérebro após a administração parenteral é geralmente baixa (ALLEN; CULLIN, 2013). Na aplicação tópica, muitas formulações preparadas à base de veículos convencionais, são liberadores ineficientes de substâncias ativas na pele, pois não conseguem ultrapassar o EC para desempenhar o seu efeito na pele (SCHMID; KORTING, 1996, PIERRE *et al.*, 2001). Devido à semelhança dos fosfolipídios presentes nos lipossomas com os lipídios da pele, esse sistema de liberação é capaz de aumentar a capacidade de penetração de fármacos nas camadas lipídicas do EC e epiderme, além de servir de depósito (efeito reservatório) nesse tecido, liberando de forma controlada fármacos, como antibióticos, corticosteróides, ácido retinóico, entre outros (WILLIAMS, 2003, PIERRE *et al.*, 2011). Os lipossomas ao interagirem com o EC desestabilizam a matriz lipídica por se misturarem ou fundirem com ela e desse modo aumentam o fluxo do fármaco na pele (KIRJAVAINEN *et al.*, 1996, KIRJAVAINEN *et al.*, 1999, MAGHRABY; BARRY; WILLIAMS, 2008). O aumento da penetração de fármacos na pele é demonstrado em vários estudos. Por exemplo, Elmoslemany e colaboradores (2012) mostraram a penetração *in vitro* do nitrato de miconazol encapsulado em lipossomas compostos por fosfatidilcolina e propilenoglicol e obtiveram um sistema carreador com liberação melhorada do fármaco na pele e permeação transdérmica mínima. Cosco e colaboradores (2015) encapsularam resveratrol e 5-fluorouracil em lipossomas compostos por fosfatidilcolina estabilizada com palmitato de ascorbila, colesterol e desoxicolato de sódio com o objetivo de utilizar no tratamento de câncer de pele não-melanoma. A co-encapsulação desses fármacos em lipossomas melhoraram a atividade anticancerígena nos estudos de viabilidade celular e análise da apoptose comparadas com a forma de fármaco livre e relacionaram esse efeito ao fato dos lipossomas poderem ficar retido por mais tempo nas camadas da pele, gerando assim um depósito cutâneo, no qual o resveratrol e 5-fluorouracil foi gradualmente liberado na pele. Também, Clares e colaboradores (2014) encapsularam palmitato de retinol em lipossomas compostos por fosfatidilcolina e mostraram que esse sistema de liberação aumentou os espaços interlamelares existentes entre o EC e a camada superior da epiderme por provavelmente aumentarem a hidratação nesse tecido, além desse sistema promover aumento da retenção do palmitato de retinol na pele.

2.2.1. Lipossomas e vacinas

Os lipossomas vêm sendo muito estudados como sistema de liberação de antígenos, principalmente para administração parenteral de vacinas (BEHERA; SWAIN; SAHOO, 2011; ROSENKRANDS *et al.*, 2011, NEELAND *et al.*, 2014). Eles podem resolver problemas de estabilização de proteínas e peptídeos, usados como antígenos, sustentar sua liberação e aumentar a imunogenicidade da vacina.

Com o objetivo de melhorar a resposta imune desejada, os lipossomas são modificados de diferentes formas. Assim, os lipossomas usados para a veiculação de vacinas podem ser classificados como: convencionais, com superfície modificada, bilossomas, entre outros. Os lipossomas convencionais são compostos por fosfolípidos tal como distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), esfingomielina, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (MUFAMADI *et al.*, 2011). O colesterol é geralmente adicionado aos lipossomas como um selante de membrana e estabilizador para melhorar a rigidez lipossomal (SOENEN; BRISSON; DE CUYPE, 2009). Os lipossomas rígidos liberam o antígeno do núcleo do lipossoma para o ambiente circundante mais lentamente de outros lipossomas. Uma das principais desvantagens desses lipossomas é a sua instabilidade no plasma (NISHIKAWA *et al.*, 1990). Os lipossomas de superfície modificada incluem, por exemplo, os lipossomas catiônicos, os quais são constituídos por lípidios carregados positivamente e que podem apresentar vantagens frente aos lipossomas neutros ou aniônicos. Uma delas é o aumento da potência das subunidades da vacina sem ter a necessidade de se aumentar a concentração do antígeno (BARNIER-QUER *et al.*, 2012; BARNIER-QUER *et al.*, 2013). Esse fenômeno pode ser explicado pela interação entre a carga positiva dos lipossomas e a carga negativa das membranas celulares das APCs. Como consequência dessa interação, os lipossomas catiônicos são mais rapidamente capturados pelas APCs. Porém, essa interação com as APCs é limitada, uma vez que o lipossoma positivo pode se ligar também a outras células e componentes do sangue (PERRIE; FREDERIK; GREGORIADIS, 2001, JOSEPH *et al.*, 2006, RANCAM *et al.*, 2012). Os virossomas também são considerados lipossomas de superfície modificada, sendo que essa estrutura mimetiza o envelope viral vazio dos vírus, como o do vírus influenza que não contem nenhum material de DNA (KANEDA, 2000). Geralmente esse envelope viral é composto por glicoproteínas, como as neuraminidase e a hemaglutinina intercaladas nas bicamadas dos lipossomas (MISCHLER; METCALFE, 2002). Os bilossomas são obtidos a partir de tensoativos não-iônicos e sais de bile. Em humanos, os sais biliares são sais de ácidos esteróides encontrados no intestino delgado que auxilia na

quebra de gordura da dieta. Esses sais atuam estabilizando as vesículas lipídicas no trato gastrointestinal (TGI), impedindo a desestabilização e a lise da membrana de modo que esses lipossomas não liberam seu conteúdo antes de alcançar o local de ação. Os lipossomas são capazes de proteger um agente encapsulado da degradação enzimática e podem também atuar como um adjuvante, sendo um sistema de liberação atrativo para a imunização oral (GHAFAR *et al.*, 2014).

Muitos estudos mostram o desenvolvimento de vacinas lipossomais para administração injetável, pois os lipossomas podem induzir imunidade humoral e celular para um grande número de antígenos. Por exemplo, vacina lipossomal administrada pela via intramuscular destinada à profilaxia da meningite mostrou grande potencial imunogênico em estudo clínico de fase I (ZOLLINGER *et al.*, 2012). Em 2010 iniciou-se um estudo multicêntrico para avaliar a segurança de vacina lipossomal para a prevenção do câncer de pulmão (BUTTS *et al.*, 2010). Em outro estudo recente, Trentini e colaboradores (2014), estudaram formulações lipossomais, com tamanho média de 4 μm , contendo a proteína antigênica HspX. Altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a foram produzidos após a administração subcutânea.

A administração pela pele de vacinas lipossomais também vem sendo estudada. Chopra & Cevc (2014), por exemplo, demonstraram que lipossomas carregados negativamente, contendo o toxóide tetânico, com tamanho médio de 100 ± 40 nm, promoveram ação protetora em camundongos. Em outro estudo, Wang e colaboradores (2007) prepararam lipossomas catiônicos com tamanho médio de 200 nm compostos por fosfatidilcolina e 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) contendo antígenos de superfície da hepatite B e avaliaram a resposta imune obtida em camundongos. Os autores observaram títulos elevados de anticorpos IgG contra o antígeno da hepatite B e altos níveis da citocina IFN- γ , indicativo da ativação de linfócitos T. Essas lipossomas foram aplicadas na pele, sob suave fricção e mantidos em contato com ela, sem remoção da formulação.

Desta forma, vacinas lipossomais para IT vêm sendo estudadas, sendo promissores sistemas de imunização. Diferente do que se observam quando os lipossomas são administrados por via parenteral, no entanto, quando administrados pela pele os lipossomas não aumentam a imunogenicidade da vacina. Devido à barreira imposta pelo EC, muitas vezes também não possibilitam a entrada de concentrações de antígenos suficientes para resultar em uma resposta imune persistente e precisam ser mantidos em contato com a pele por longos períodos para que o antígeno possa penetrar.

Para contornar esses problemas, métodos físicos vêm sendo associados às formulações de uso tópico para aumentar e acelerar a penetração cutânea de antígenos.

2.3. Métodos Físicos e Vacinação

Eletroporação, sonoforese, microagulhas e injetores a jato são métodos físicos estudados atualmente para aumentar a penetração de antígenos na IT.

O ultrassom é uma onda longitudinal, com frequência acima da audível pelo ouvido humano (> 20 kHz) que é utilizado para permeabilizar o EC. Esse método físico tem mostrado resultados satisfatórios em aumentar a penetração de fármacos na pele, principalmente os hidrofílicos e macromoléculas através da cavitação acústica transiente que ocorre no meio de acoplamento durante a aplicação do ultrassom. Assim, quando aplicado em um meio de acoplamento, nucleia bolhas na solução, as quais se tornam instáveis e como consequência do grande gradiente de pressão local, implodem. Isso resulta em um jato de líquido que pode penetrar o EC, carreando o fármaco. O potencial do ultra-som de baixa frequência em induzir resposta imune em ratos foi investigado por Dahlan e colaboradores (2009) usando o toxóide tetânico como modelo de vacina. Foi demonstrado que a concentração de lauril sulfato de sódio, utilizado como meio de acoplamento, afeta o resultado da imunização, já que foram detectados títulos de anticorpos mais elevados utilizando uma solução a 0,5% (p/p) e títulos mais baixos foram induzidos quando não foi usado lauril sulfato de sódio ou quando foram usadas concentrações mais elevadas. Além disso, Tezel e colaboradores (2005) mostraram que a aplicação de ultrassom de baixa frequência promove a ativação de células de Langerhans na resposta imune.

As microagulhas são estruturas semelhantes às agulhas com diâmetros da ordem de micrometros e comprimentos de até 1 mm. Elas são utilizadas para perfurar as camadas superiores da pele, criando rotas alternativas de tamanho suficientemente grande para o transporte de antígenos proteicos ou sistemas nanoparticulados e assim permitem a liberação dérmica ou transdérmica de fármacos e antígenos (GARDENIERS *et al.*, 2003, SCHOELLHAMMER; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2014). As primeiras microagulhas desenvolvidas para liberação de fármacos foram preparadas a partir de pastilhas de silício (HENRY *et al.*, 1998, MCALLSITER; ALLEN; PRAUSNITZ, 2000). No entanto, o seu processo de produção é caro, além da desvantagem de serem frágeis, podendo quebrar na pele durante a aplicação (ARORA; PRAUSNITZ; MITRAGOTRI, 2008; BANGA, 2009). Já microagulhas poliméricas podem ter mais benefícios, já que são materiais mais baratos,

biocompatíveis e passíveis para produção em massa (PARK; ALLEN; PRAUSNITZ, 2005; LUTTGE *et al.*, 2007). Estudos mostram que pesquisadores são capazes de produzir microagulhas a partir de diferentes materiais, com diferentes geometrias e dimensões. Porém até o momento não existem sistemas de administração de fármacos à base de microagulhas no mercado. Outro fator importante é que as microagulhas devem ser capazes de perfurar a pele de maneira reprodutível, garantindo que os pacientes recebam as mesmas doses a cada administração (MAADEN; JISKOOT; BOUWSTRA, 2012).

Os injetores a jato fazem uso da pressão para a entrega de substâncias dentro da pele, porém tem-se o inconveniente da dor e a necessidade de cadeia gelada para o transporte das ampolas que são semelhantes às utilizadas na vacinação convencional (MATSUO *et al.*, 2013).

A eletroporação é o método físico mais estudado na IT. Ela consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte da pele. Isto porque a aplicação de pulsos de alta voltagem na pele promove a formação transitória de poros aquosos na bicamada lipídica do EC, permitindo que macromoléculas migrem através desses poros (ENGELKE *et al.*, 2015). A primeira investigação utilizando eletroporação para a vacinação cutânea foi realizada em 1999 por Misra e colaboradores. Os pesquisadores utilizaram dois antígenos modelos: o toxóide tetânico e um peptídeo miristilado e realizaram os experimentos *in vivo* em camundongos. Diferentes resultados da eficácia de imunização transcutânea foram relatados por eles. A resposta imune humoral ao toxóide tetânico foi menor usando a eletroporação em relação à injeção intradérmica, enquanto maiores títulos de anticorpos foram obtidos utilizando um peptídeo miristilado quando administrado em associação com a eletroporação. Zhao e colaboradores (2006) observaram respostas celulares equivalentes utilizando a eletroporação e injeção intradérmica usando um peptídeo antigênico. Mais notavelmente, os pesquisadores relataram que a eletroporação sozinha promoveu a migração de células de Langerhans para os linfonodos da pele. Outro ponto importante, é que os estudos realizados com vacinas baseadas em DNA estão ganhando grande importância, principalmente por causa de seu perfil de segurança favorável em comparação com métodos baseados em vetores. No entanto, esse tipo de vacina era incapaz de induzir respostas imunes potentes porque o DNA não era internalizado no núcleo da célula. A associação com a eletroporação permitiu a absorção eficiente do material de DNA, resultando na publicação de muitos artigos. Em um estudo de Livingston (2010), altos títulos de anticorpos foram produzidos com a associação da eletroporação e do antígeno protetor do antraz em

comparação com uma vacina contra o antraz aprovada pelo FDA. Outro resultado interessante foi que altos títulos de anticorpos contra o antígeno foram encontrados um ano após a imunização com o uso da eletroporação. Em outro estudo, Vasan e colaboradores (2011) investigaram o uso da eletroporação na imunização de voluntários saudáveis através da administração de uma vacina de DNA de HIV-1. A imunidade celular foi aumentada mais de 70 vezes em comparação com vacinação sem eletroporação. Além das respostas mais robustas, a eletroporação também facilitou um efeito poupador de dose. Porém, dor local e fraqueza foram relatadas pelos voluntários que foram submetidos à eletroporação.

Apesar da eletroporação permeabilizar a pele facilitando a entrada de antígenos, este método possui algumas desvantagens. A principal delas está relacionada aos danos celulares irreversíveis que ela pode causar. Como os pulsos são de grande intensidade (50 – 1500 V) e comprimento (10 μ s-10 ms), alguns poros formados podem ser muito grandes e serem incapazes de se fechar após a aplicação da eletroporação, causando a ruptura da membrana. Além disso, o transporte de substâncias para dentro das células não é específico, podendo promover a entrada de íons indesejados, o que pode causar danos nas suas funções e futura morte celular (EDWARDS *et al.*, 1995, MATSUO *et al.*, 2013).

Uma alternativa à eletroporação seria a iontoforese, que também é um método físico que utiliza eletricidade para facilitar a penetração de substâncias na pele, mas a corrente elétrica aplicada é de baixa intensidade. A iontoforese é bastante empregada para aumentar a penetração cutânea de fármacos (BANGA; CHIEN, 1988, JADOUL; BOUWSTRA; PREAT, 1999; KALIA *et al.*, 2004; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008), mas até o momento nenhum estudo associou a administração de antígenos com a iontoforese.

2.3.1. Iontoforese

A iontoforese é um método físico, não-invasivo e seguro, que propicia a penetração cutânea de moléculas ionizadas, polares, peptídeos e de outras macromoléculas que seriam incapazes de penetrar a pele passivamente (LOPEZ *et al.*, 2003, LOPEZ *et al.*, 2004, ROUSTIT; BLAISE; CRACOWSKI, 2013, PATEL *et al.*, 2015). Nela, uma corrente elétrica de baixa intensidade (até 0,5 mA/cm²) é aplicada em uma formulação eletrolítica em contato com a pele. Durante a iontoforese, a corrente elétrica atravessa esta formulação e a pele, carregando os íons presentes no sistema. A passagem da corrente elétrica através da formulação eletrolítica e da pele depende dos íons que compõem a formulação, pois a corrente elétrica é por eles carregada (Figura 3). A iontoforese pode aumentar a liberação de

substâncias com meia-vida curta diretamente nos tecidos, além de permitir um melhor controle no transporte de fármacos, garantindo dosagem adequada e boa aceitação pelo paciente.

Figura 3. Representação esquemática do transporte iontoforético. Fármacos carregados positivamente (D^+) migram do ânodo, já fármacos carregados negativamente (D^-) migram do cátodo. As setas, vermelha e azul, representam o mecanismo de eletromigração anódica e catódica, respectivamente. A seta roxa representa o mecanismo de eletrosmose (Adaptado de ROUSTIT; BLAISE; CRACOWSKI, 2013).

Na iotoforese, a corrente elétrica de baixa intensidade é fornecida por uma fonte de energia ou bateria e distribuída com o auxílio de um eletrodo positivo (ânodo) e um eletrodo negativo (cátodo). Os eletrodos convencionalmente usados na iotoforese são os de Ag/AgCl. Eles não causam variação de pH, pois suas trocas eletroquímicas ocorrem a uma voltagem inferior à necessária para a eletrólise da água (PANCHAGNULA *et al.*, 2000, KALIA *et al.*, 2004).

O transporte iontoforético se baseia nos mecanismos de eletromigração e eletrosmose. O primeiro refere-se ao movimento ordenado dos íons na presença da corrente elétrica e está diretamente relacionado com o fluxo da corrente elétrica, ou seja, cátions em contato com o ânodo migram em direção ao cátodo e vice-versa (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008). A contribuição do fluxo eletromigratório para a penetração de fármaco na pele depende da carga elétrica do fármaco, de sua mobilidade eletroforética, de sua concentração e da densidade da corrente elétrica (Equação I).

$$J_{\text{total}} = \frac{z_p u_p c_p I}{F \cdot \sum z_i u_i c_i} \quad \text{Equação I}$$

Onde: Z_p , u_p , C_p referem-se à carga, mobilidade e concentração do fármaco, respectivamente, I é a densidade da corrente elétrica, F é a constante de Faraday (96.500 C).

Substâncias não ionizadas também pode se beneficiar com a iontoforese porque penetram a pele pela contribuição do fluxo eletrosmótico. A eletrosmose refere-se ao fluxo de um volume de solvente e movimentação de cargas quando uma diferença de potencial elétrico é aplicada em uma membrana biológica. Quando a formulação em contato com a pele apresenta pH fisiológico, este fluxo de solvente é maior do ânodo em direção ao cátodo do que o inverso. Isto se deve ao fato de que o EC (pI entre 4,0 e 4,5) se encontra negativamente ionizado quando em contato com formulações em pH acima de aproximadamente 5, favorecendo o transporte de cátions e dificultando o de ânions. Sendo assim, a aplicação de um campo elétrico induz o movimento de certo volume de solvente do ânodo para o cátodo e este impulso é transferido para as moléculas neutras presentes na formulação. Portanto, o fluxo de solvente ou fluxo eletrosmótico faz com que: (i) o fluxo de moléculas neutras através da pele seja aumentado quando as mesmas são colocadas em contato com o ânodo em pH fisiológico (LOPEZ *et al.*, 2003) e (ii) os cátions presentes no ânodo se beneficiem desta segunda força adicional à eletromigração (GUY *et al.*, 2000).

Pode-se controlar o fluxo iontoforético de fármacos através da pele pela manipulação de fatores elétricos, ajustando-se o perfil e a densidade da corrente elétrica. Mas parâmetros da formulação também podem ser manipulados para direcionar a liberação de substâncias para determinada camada da pele, como: a concentração do fármaco, o pH (adequando porcentagem de moléculas ionizadas e a carga residual da pele), a concentração de íons estranhos e a estabilidade do fármaco na formulação. Pode-se também manipular a formulação com componentes que tenham afinidade pelos lipídeos da pele e, após penetrarem, permaneçam em contato com eles. Isto porque a iontoforese pode facilitar não só a penetração de fármacos na pele, mas também a penetração cutânea de componentes da formulação (TAVEIRA *et al.*, 2009).

Com isto em mente, alguns estudos investigaram a influência da associação da iontoforese com lipossomas na penetração de fármacos através da pele. Estudos como o de Kajimoto e colaboradores (2011) aperfeiçoaram a composição de lipossomas com o objetivo de encapsular insulina e aumentar sua penetração transcutânea pela aplicação da iontoforese. Dessa forma, lipossomas compostos por DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano), PC

(fosfatidilcolina), colesterol (2:2:1) e insulina foram submetidos à corrente elétrica de intensidade de $0,45 \text{ mA/cm}^2$, durante 1 h. Os pesquisadores observaram diminuição gradual dos níveis de glicose no sangue de ratos, alcançando 20% do valor inicial após 18 h da administração, sendo estes níveis mantidos por até 24 h (KAJIMOTO *et al.*, 2011). A iontoforese de lipossomas encapsulando encefalina também proporcionou resultados positivos, como menor degradação do fármaco e aumento de sua liberação através da pele (VUTLA *et al.*, 1996). Em um outro estudo, o encapsulamento da colchicina neutra em lipossomas carregados positivamente aumentou de 2 a 3 vezes a liberação do fármaco na pele quando a iontoforese foi aplicada (KULKARNI *et al.*, 1996). Adicionalmente, a associação de lipossomas encapsulando estradiol e iontoforese promoveu maior penetração do hormônio quando comparado com a liberação passiva do mesmo (ESSA *et al.*, 2002). Recentemente, Mohammed e colaboradores (2015) verificaram a influência da iontoforese catódica na penetração de lipossomas deformáveis carregados negativamente contendo vancomicina. A iontoforese catódica dos lipossomas aumentou mais a penetração transcutânea do fármaco do que a iontoforese anódica do fármaco livre.

Na área de imunização transcutânea, até o momento, não há publicação envolvendo a iontoforese para a veiculação de antígenos.

2.4. Adjuvantes imunológicos

Os adjuvantes têm sido tradicionalmente usados para aumentar a magnitude da resposta adaptativa a uma vacina, com base nos títulos de anticorpos, mas também orientam o tipo de resposta adaptativa para produzir as formas mais eficazes de imunidade para cada patógeno específico (KENNEY; CROSS, 2010, PULENDRAN *et al.*, 2010). Dessa forma, os adjuvantes são utilizados para: (1) aumentar a resposta a uma vacina na população em geral, aumentando os títulos de anticorpos; (2) aumentar a resposta imune em populações com capacidade de resposta reduzida por causa da idade (por exemplo, bebês e os idosos), doença ou intervenções terapêuticas (PODDA, 2001, BERAN, 2008); (3) facilitar o uso de doses menores de antígenos (BOYLE *et al.*, 2007, BANZHOFF *et al.*, 2009, SCHWARZ *et al.*, 2009), porque o adjuvante pode promover proteção imunológica com quantidades substancialmente mais baixas de antígeno, o que é muito importante nos casos de vacinação em larga escala, produção limitada de vacinas, como no surgimento de uma pandemia de um novo vírus da gripe e (4) imunização com o menor número de doses de vacina (HALPERIN *et al.*, 2006, BANZHOFF *et al.*, 2009, SCHWARZ *et al.*, 2009).

O interesse no desenvolvimento de adjuvantes é antigo. Desde 1925, diversos adjuvantes vêm sendo usados com o objetivo de aumentar a resposta imune contra antígenos específicos. Ramon demonstrou ser possível aumentar artificialmente os níveis das antitoxinas tetânicas e diftéricas pela adição à vacina de substâncias como o ágar, sais metálicos, óleo, lecitina ou saponina (RAMON, 1925, RAMON, 1926).

Os adjuvantes de primeira geração são partículas de diferentes composições, com tamanho semelhante e inclui o adjuvante mais utilizado; os sais de alumínio. Os sais de alumínio consistem de precipitados de fosfato de alumínio e hidróxido de alumínio, no qual os antígenos são adsorvidos (O'HAGAN *et al.*, 2013). Embora se pensasse que a sua atividade era devido à formação de um depósito do antígeno que promovia a sua absorção pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), hoje é claro que a estimulação do sistema imune inato desempenha um papel primordial na atividade desse adjuvante (LAMBRECHT *et al.*, 2009, MARRACK; MCKEE; MUNKS, 2009). A maioria dos outros adjuvantes de primeira geração são as emulsões, lipossomas e micro ou nanopartículas, que são frequentemente utilizados para a liberação de fármacos. Além desses, tem-se também as saponinas que é um produto natural derivado da casca de árvore utilizado para fazer os ISCOMs, os quais são complexos imunoestimulantes que incorporam antígenos nas saponinas (O'HAGAN *et al.*, 2013). Por exemplo, o primeiro adjuvante aprovado depois dos sais de alumínio foi uma emulsão óleo/água, chamada MF59, adicionada em uma vacina contra a gripe baseada em lipossomas (BRITO; O'HAGAN, 2014). Assim, os adjuvantes de primeira geração eram frequentemente chamados de "sistemas de liberação de antígeno", uma vez que se acreditava que esses sistemas promovessem principalmente a captação do antígeno para dentro das células do sistema imunológico. Por exemplo, uma vacina nanoparticulada contra a gripe foi preparada com hemaglutinina viral geneticamente fundida com ferritina. Kanekijo e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas usando hemaglutina, a qual é uma das principais proteínas antigênicas que revestem o vírus da gripe e a ferritina, a qual é uma proteína de reserva de ferro que forma aglomerados esféricos. Essas moléculas foram manipuladas, formando uma estrutura muito particular que imitam a hemaglutinina do vírus influenza. Essa vacina foi capaz de induzir de modo eficaz anticorpos neutralizantes contra o vírus da gripe. Contudo, apesar dos antígenos serem apresentados numa forma de partículas semelhantes aos vírus (*vírus like*), os pesquisadores acharam necessário a adição de um adjuvante óleo/água.

Os adjuvantes de segunda geração foram baseados nos de primeira geração que tiveram mais sucesso, uma vez que compreendem os sistemas de liberação de primeira

geração, como: alumínio, emulsão, lipossoma ou micropartícula, em conjunto com um ou mais "potenciadores do sistema imunológico", também chamados de imunopotenciadores e que estimulam o sistema imune inato (BRITO; O'HAGAN, 2014). No entanto, a indução bem sucedida da imunidade adaptativa, a qual é induzida na administração de vacinas, não depende apenas do reconhecimento do antígeno, mas também depende de sinais essenciais que são entregues pelo sistema imune inato (SCHENTEN; MEDZHITOV, 2011). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra os patógenos, mediado pelos leucócitos, macrófagos, células dendríticas e pelo sistema complemento. Ele responde imediatamente após a infecção usando um número limitado de receptores de reconhecimento padrões (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que estão presentes nos agentes invasores que infetam o organismo. A função dos PRRs é de sensor, que alerta o sistema imunológico do "perigo" todas as vezes que o hospedeiro é infetado. As respostas inatas são normalmente mais rápidas do que as adaptativas, com respostas que ocorrem dentro de minutos a horas, em vez de dias a semanas. No entanto, as respostas inatas também diminuem rapidamente. Por isso, o trabalho de imunidade inata e adaptativa em conjunto pode oferecer proteção máxima contra a invasão do patógeno, com o sistema inato "não específico" que está sendo ativado imediatamente após a infecção, enquanto o sistema adaptativo mais complexo responde mais lentamente ao desencadear anticorpos específicos e respostas de células T. Os PRRs mais conhecidos, e também um dos mais explorados como adjuvantes, são os agonistas de TLR (MEYLAN; TSCHOPP; KARIN, 2006, COFFMAN; SHER; SEDER, 2010). Os Agonistas de TLR foram estudados extensivamente durante os últimos anos (DUTHIE *et al.*, 2010). Do TLR 1 ao 10, os agonistas de TLR 3, 4, 5, 7, 8 e 9 foram mais amplamente estudados e avançados para desenvolvimento clínico. Agonistas de TLR3 foi utilizado extensivamente em ensaios clínicos, em especial para vacinas contra o câncer (BODE *et al.*, 2011, TOMAI; VASILAKOS, 2011). O TLR4, expresso na membrana plasmática de macrófagos humanos e células dendríticas, bem como em outros tipos de células de mamíferos, adsorvido com o lipídio A monofosforilado (MPL) já está aprovada para uso humano e é comercializado. A vacina contra o HPV produzida pela GlaxoSmithKline disponível comercialmente contém uma associação de sais de alumínio e MPL, também conhecido como AS04, que é a combinação de alumínio com o agonista TLR 4 co-adsorvido com o MPL (ROLDAO *et al.*, 2010).

2.4.1. Partículas metálicas como adjuvantes imunológicos

Diversas formas de prata, tais como prata metálica, nitrato de prata e sulfadiazina de prata têm sido utilizadas para tratar queimaduras, feridas e muitas infecções bacterianas. Com o advento dos antibióticos, a prata ficou em segundo plano, porém com o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos renovou-se o interesse nos compostos de prata (PRABHU; PATRAVEL; JOSHI, 2012). Nos últimos anos, a prata vem sendo estudada na área de imunização. Por exemplo, Jazayeri e colaboradores (2012) prepararam nanopartículas de prata com tamanho de 12 nm para ser usado como sistema de liberação de uma vacina de DNA para administração oral. As nanopartículas de prata (NPAg) foram sintetizadas para estabilizar esse sistema de liberação e foram obtidas por um método chamado “tecnologia verde”, o qual não utiliza substâncias tóxicas ao meio ambiente e faz uso de pouco solvente. O DNA utilizado foi o plasmídeo que codifica o gene da hemaglutinina do vírus da gripe aviária. Uma única imunização oral em galinhas resultou na indução de resposta imune humoral e celular, além do aumento do nível das citocinas. Além disso, as NPAg foram consideradas não citotóxicas. O efeito adjuvante imunológico de nanopartículas de prata foi investigado por XU e colaboradores (2013) através de estudo realizado *in vivo* com OVA e albumina do soro bovino em camundongos, administrando as formulações por via subcutânea e intraperitoneal. Os níveis de IgG específico para OVA aumentou significativamente nos animais tratados com as NPAg para os dois modelos de antígenos utilizados. O aumento de anticorpos IgG1 em relação ao IgG2a indicou que as NPAg induziram resposta via Th2. Em ensaios *in vitro*, observou-se o aumento do número de leucócitos e das citocinas TNF- α e IFN- γ . A expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe II na superfície de macrófagos peritoneais aumentou significativamente e as nanopartículas puderam ser facilmente fagocitadas por macrófagos peritoneais, enquanto não afetou a absorção de antígeno pela célula. Os pesquisadores concluíram que as NPAg têm efeito adjuvante significativo e o mecanismo deste efeito é atribuído principalmente ao recrutamento e ativação de leucócitos locais e dos macrófagos.

O método mais tradicional para a obtenção das NPAg é através da redução do nitrato de prata pelo boroidreto de sódio a temperatura ambiente sob agitação. Essa dispersão apresenta comprimento de onda no espectrofotômetro UV/Vis de 399 nm (CREIGHTON; BLATCHFORD; ALBRECHT, 1979, SUH; DILELLA; MOSKOVITS, 1983, SCHWARCKE *et al.*, 2010). Outro método que está sendo bastante utilizada para a síntese de nanopartículas, citado anteriormente, é chamado de “tecnologia verde”, uma vez que usam

extratos de plantas como agente redutor e vem sendo considerado menos agressivo ao meio ambiente. No estudo de Saxena e colaboradores (2012), os pesquisadores utilizaram o extrato da folha de *Ficus benghalensis* como um agente redutor do nitrato de prata e consideraram um método rápido e conveniente para a síntese de NPAg. A caracterização por espectroscopia do UV-Vis mostrou absorção máxima em 410 nm e tamanho das partículas de 16 nm. No estudo de Kouvaris e colaboradores de (2012), os autores sintetizaram nanopartículas de prata a partir de nitrato de prata e do caldo da folha do *Arbutus unedo*, que agiu como agente redutor e estabilizador simultaneamente. As nanopartículas apresentaram tamanho de 30 nm e absorção máxima no uv/vis em 437 nm.

Além da prata, nanopartículas de ouro também são estudadas para estimular o sistema imune, podendo atuar como adjuvantes imunológicos. Bastús e colaboradores (2009) estudaram a conjugação com diferentes peptídeos com nanopartículas de ouro. Os macrófagos da medula óssea de camundongos foram capazes de reconhecer os conjugados de peptídeos com nanopartículas de ouro, enquanto que os peptídeos ou as nanopartículas por si só não foram reconhecidos. Por conseguinte, na presença de conjugados foi induzida a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Além disso, a ativação de macrófagos por conjugados de nanopartículas de ouro com diferentes peptídeos pareceu ser independente do comprimento do peptídeo e polaridade, mas dependente do padrão de peptídeo na superfície da nanopartícula. Esses resultados ajudam a ilustrar os requisitos básicos para que o conjugado de nanopartículas possa tanto ativar ou passar despercebidos ao sistema imune. O efeito adjuvante de nanopartículas de ouro também foi estudado por Huang e colaboradores (2010) que sintetizaram nanopartículas de ouro com tamanho de 5 nm e verificaram que esse sistema permite a liberação de proteína na pele, devido à interação desse sistema com os lipídios da pele, induzindo aberturas de poros transientes e reversíveis no estrato córneo. Assim, quando as nanopartículas de ouro foram administradas em associação com a OVA, também foi observada a capacidade desse sistema em ultrapassar a barreira da pele e migrar e para as camadas mais profundas da pele. Explorando essa propriedade das nanopartículas de ouro, os pesquisadores desenvolveram uma estratégia de liberação de vacina não-invasivo para ser aplicada topicamente, já que altos títulos de anticorpos IgG foram obtidos após a administração dessa formulação.

As nanopartículas de ouro podem também aumentar a estabilidade dos lipossomas em contato com a pele. Pornpattananangkul e colaboradores (2010) mostraram que nanopartículas de ouro ligadas a superfície de lipossomas evitam a fusão entre as vesículas lipossomais,

promovendo a estabilização das mesmas antes de atingirem o local de ação, bem como durante o período de armazenamento. Portanto, a obtenção de lipossomas associados à nanopartículas metálicas pode aumentar a estabilidade desses lipossomas e associados a iontoforese, as nanopartículas metálicas podem aumentar a eficiência da corrente elétrica e facilitar tanto a penetração do antígeno encapsulado nos lipossomas quanto a penetração das próprias nanopartículas metálicas.

Como não há relatos da associação de lipossomas e iontoforese visando a imunização transcutânea, acredita-se que é de grande relevância o desenvolvimento do presente trabalho.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Estudar a influência da iontoforese na imunização transcutânea associada ou não a lipossomas estabilizados com nanopartículas de prata (NPAg) usando ovalbumina (OVA) como antígeno modelo.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar lipossomas aniônicos e catiônicos contendo OVA adicionados de NPAg;
- Investigar a integridade da OVA nas formulações desenvolvidas;
- Verificar a estabilidade física dos lipossomas aniônicos e catiônicos contendo OVA e NPAg frente à aplicação da corrente elétrica.
- Estudar, *in vitro*, a penetração iontoforética da OVA a partir dos lipossomas aniônicos e catiônicos contendo ou não NPAg, bem como da dispersão de OVA em tampão fosfato;
- Estudar a influência da iontoforese e das nanopartículas metálicas presentes nos lipossomas contendo OVA na resposta imune induzida;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A OVA, proveniente do ovo branco utilizada nesse trabalho ($\geq 98\%$ de pureza) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os fosfolípidos PC, DOPE, PE, DMPC e DOTAP foram obtidos da Lipoid (Ludwigshafen, Baden-Württemberg, Alemanha). O clorofórmio foi adquirido da J.T. Baker (Center Valley, CA, USA). Água ultrapurificada (Milli-Q Millipore Simplicity 185, Bedford, MA, USA) foi utilizada no preparo de todas as soluções.

4.2. Pele

A pele utilizada nos experimentos de permeação iontoforética *in vitro* foi retirada das orelhas de porcos dentro de 1 hora após o sacrifício do animal, previamente aos procedimentos de escaldagem (Abatedouro Ipuã, Ipuã, São Paulo). A gordura subcutânea foi removida da pele com o auxílio de uma lâmina e após, a pele foi seccionada em tiras e armazenada em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 6 meses. Antes da sua utilização, a pele foi descongelada e o excesso de pêlos foi então aparado. A pele descongelada foi cortada em amostras com aproximadamente 2 cm^2 .

4.3. Animais de laboratório

Camundongos fêmeas de 8 a 12 semanas (18 - 22 g), da linhagem BALB/c foram adquiridos do Biotério Central do Câmpus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram criados e utilizados nos experimentos de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo CEUA – Comissão de Ética no uso de animais de experimentação do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os experimentos realizados com estes animais foram aprovados por este Comitê de Ética (número de protocolo 10.1.1052.53.9 – anexo I).

4.4. Padronização de metodologia analítica para quantificação da OVA por espectrofotometria no UV/Vis

No estudo de eficiência de encapsulação da OVA aos lipossomas, as quantidades de OVA foram determinadas por espectrofotometria na região do UV/Vis, utilizando-se o espectrofotômetro de UV/Vis (Agilent Technologies 8453) e cubetas de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico. O comprimento de onda (λ) utilizado foi de 280 nm, determinado de acordo com o item 4.4.1.

4.4.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{MÁX}$) da OVA no UV/Vis

Foi realizada a varredura de uma solução de OVA em tampão fosfato pH 7,4 0,01 M na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, em espectrofotômetro UV/Vis, na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm. O comprimento de onda referente à absorção máxima ($\lambda_{MÁX}$) do fármaco no UV/Vis foi selecionado para sua quantificação por análise espectrofotométrica direta das amostras.

4.4.2. Validação da metodologia analítica

A metodologia analítica utilizada para a quantificação da OVA foi validada visando assegurar sua qualidade e confiabilidade, segundo recomendações descritas na literatura (CAUSON, 1997). Essa validação foi baseada nos parâmetros analíticos de linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade (FDA, 2001).

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curvas analíticas, em triplicata para cada concentração, com valores expressos em $\mu\text{g/mL}$, a partir de soluções da OVA em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4 nas concentrações de 100, 250, 500, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{g/mL}$. A partir dos resultados obtidos foram construídas curvas analíticas relacionando-se as absorbâncias obtidas com as suas respectivas concentrações. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de intersecção da reta com o eixo das ordenadas. As faixas lineares foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação linear (r), como o critério mínimo aceitável de $r = 0,99$ (FDA, 2001).

Precisão

A precisão intra-ensaio foi verificada analisando-se três concentrações (baixa, média e alta) indicando o intervalo linear do método, em quintuplicata para cada concentração. Desta forma, foram avaliadas soluções de OVA nas concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os

resultados foram expressos matematicamente através do coeficiente de variação (CV%), calculado através da equação II:

$$CV = \left(\frac{Desv.Padrão}{Conc.Média} \right) \times 100 \quad \text{Equação II}$$

Onde: *Desv.Padrão* é a estimativa do desvio padrão da média e *Conc.Média* é a média das medidas em quintuplicata para cada concentração analisada (FDA, 2001).

A precisão inter-ensaio foi determinada avaliando-se soluções de OVA nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL, em quintuplicata para cada concentração, analisadas durante três dias consecutivos. Os resultados também foram expressos matematicamente através do CV% (equação II).

Exatidão

A exatidão intra-ensaio e inter-ensaio foram avaliadas da mesma forma que a precisão e utilizando-se as mesmas concentrações (100, 500 e 1000 µg/mL). Os resultados foram expressos em função da porcentagem de erro relativo, de acordo com a equação III (CAUSON, 1997):

$$E\% = \left(\frac{Valorobtido - Valorreal}{Valorreal} \right) \times 100 \quad \text{Equação III}$$

Onde: *E%* corresponde à porcentagem de erro relativo; *Valorobtido* corresponde à concentração obtida após a análise e *Valorreal* corresponde à concentração que deveria ser encontrada após a análise.

Sensibilidade

A sensibilidade (limite de quantificação) foi determinada a partir da leitura em espectrofotômetro de soluções da OVA nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL, todas em quintuplicata, e analisadas com base na curva analítica preparada nas concentrações de 100 a 1500 µg/mL. Os resultados foram expressos matematicamente através do CV% (Equação II) e *E%* (Equação III).

Seletividade

Estudou-se a interferência dos fosfolípidos PC e DOPE na quantificação da OVA por espectrofotometria em UV/Vis, $\lambda_{M\acute{A}X} = 280$ nm, através da varredura das suspensões dos fosfolípidos isolados e associados em clorofórmio na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, na faixa de 200 a 800 nm.

4.5. Obtenção das dispersões lipossomais

4.5.1. Preparo geral dos lipossomas

Os lipossomas aniônicos foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico, sendo estudadas diferentes composições de lipídios e concentrações de OVA. Foi adicionado 2 mL de clorofórmio aos lipídios e em seguida a solução formada foi submetida à rota-evaporação (evaporador rotativo MA 120, Marconi[®]) em balão de fundo redondo de 100 mL. Os filmes lipídicos foram hidratados com 50 mL da dispersão de OVA em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4, submetidos à agitação de 15000 rpm em ultra-turrax[®] (IKA T25 digital), seguido de homogeneização em homogeneizador de alta pressão (EmulsiFlex-C3, AVESTIN, Inc.) (Figura 4). O tempo de agitação no ultra-turrax[®] e o número de ciclos foi padronizado como descrito no tópico 4.5.2 (Padronização do tempo de homogeneização dos lipossomas) com o objetivo de uniformizar o tamanho dos lipossomas e facilitar seu preparo. Depois de homogeneizada a dispersão de lipossomas foi filtrada em membrana de 0,45 μm . Ambas as etapas de evaporação e a hidratação do filme lipídico foram feitas a 25°C.

Figura 4. Preparo do lipossoma por hidratação do filme lipídico (Adaptado de LASIC, 1993).

A Tabela 1 representa a composição dos lipossomas aniônicos.

Tabela 1. Composição dos lipossomas aniônicos utilizando diferentes composições de lipídios.

Lipídios*	Proporção de lipídios	Concentração de OVA (mg/mL)
PC/DOPE/DOTAP	4:2:3	0,25 5
PC/DOTAP	3:1	0,25 5
PC/PE	3:1	0,25 5
PC/EPC-3	3:1	0,25 5

*PC: fosfatidilcolina

DOPE: dioleoilfosfatidiletanolamina

DOTAP: dioleoiltrimetilamôniopropano

PE: fosfatidiletanolamina

EPC-3: fosfatidilcolina hidrogenada

Lipossomas catiônicos também foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico, utilizando diferentes associações de lipídios, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos lipossomas catiônicos utilizando diferentes composições de lipídios e OVA.

Lipídios	Proporção de lipídios	Concentração de OVA (mg/mL)
PC/DOTAP	1:1	0,25 5
PC/DOTAP	3:1	0,25 5
PC/DOPE/DOTAP	4:2:1	0,25
PC/ colesterol/ DOTAP	3:4:3	0,25
DMPC/DOTAP	1:1	0,25 5
DMPC/DOTAP	2:1	0,25
DOTAP	-	0,25 5

* PC: fosfatidilcolina

DOTAP: dioleoiltrimetilamôniopropano

DOPE: dioleoilfosfatidiletanolamina

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

4.5.2. Padronização do tempo de homogeneização dos lipossomas

Com o objetivo de obter lipossomas de menor tamanho e baixo índice de polidispersividade foi padronizado o tempo de homogeneização do filme lipídico hidratado, tanto por ultra-turrax[®] como por homogeneização por alta pressão. Desse modo, foi retirada uma alíquota da suspensão de lipossomas contendo 5 mg/mL de OVA durante a agitação de 15000 rpm no ultra-turrax[®], nos tempos de: 10, 20 e 30 min. No homogeneizador de alta pressão os tempos de coleta foram: 2, 4, 8, 12, 16 e 20 min, o que equivale a 1, 2, 4, 6, 8 e 10 ciclos, respectivamente, com a pressão padronizada em 1000 bar durante todo o processo. As amostras retiradas foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas com relação ao tamanho médio e índice de polidispersividade (item 4.6).

4.5.3. Incorporação das NPAg às dispersões lipossomais

Uma suspensão de NPAg foi preparada com a colaboração do grupo da Professora Patrícia Nicolucci, do Departamento de Física da USP-Ribeirão Preto. Elas foram obtidas pela redução de 8 mM de nitrato de prata em 4 mM de boroidreto de sódio a temperatura ambiente, com agitação em vórtex, *overnigh* (SCHWARCKE et al., 2010). A dispersão foi analisada em espectrofotômetro UV/Vis, na faixa de comprimento de onda (λ) de 200 a 800 nm para verificar a formação das mesmas (CREIGHTON; BLATCHFORD; ALBRECHT, 1979; SUH; DILELLA; MOSKOVITS, 1983).

A dispersão de NPAg assim obtida foi incorporada aos lipossomas durante a fase de hidratação do filme lipídico (item 4.5.1.). Dessa forma, 10 mL da dispersão de NPAg (29 μ M de Ag) foi adicionada ao balão volumétrico de 100 mL juntamente com 500 mg de OVA e completado o volume com tampão fosfato 0,01 M pH 7,4. Após, o sistema foi agitado por 20 min em ultra-turrax e homogeneizado no homogeneizador de alta pressão por 20 min (10 ciclos a 1000 bar). Em seguida essa dispersão foi filtrada em membrana de 0,45 μ m e realizada as análises de medida de tamanho, índice de polidispersividade, potencial zeta, bem como eficiência de encapsulação e análise morfológica (item 4.6).

4.6. Caracterização dos lipossomas

4.6.1. Tamanho da partícula e índice de polidispersividade

A distribuição do tamanho e índice de polidispersividade (PdI) das dispersões foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons usando o aparelho Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern) no ângulo de 90° e temperatura de 25°C. As formulações que apresentaram partículas com tamanho reduzido e PdI menor do que 0,3 foram submetidas aos estudos subsequentes de eficiência de encapsulação e análise morfológica.

4.6.2. Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado baseado na mobilidade eletroforética dos lipossomas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern).

4.6.3. Determinação do valor de pH

Foi empregado o peagômetro (Digimed DM-20) para a medida dos valores de pH.

4.6.4. Eficiência de encapsulação (EE %)

Para o cálculo da eficiência de encapsulação (EE), no qual a OVA não encapsulada (livre) é separada da OVA encapsulada, utilizou-se o método da ultracentrifugação usando o dispositivo AMICON Ultra Ultracel 100 K (Millipore, 100 kDa). A dispersão de lipossomas (1 mL) foi adicionada no compartimento superior do dispositivo AMICON, o qual é separado do inferior por uma membrana de filtração com porosidade de 100 kDa. Após centrifugação a 6.000 rpm, por 40 min, a 25°C, a fração de OVA livre, não encapsulada (*Qnãoencapsulada*), foi coletada no compartimento inferior do dispositivo e quantificada por análise espectrofotométrica de UV/Vis no comprimento de onda de 280 nm.

O valor da EE% foi calculado de acordo com a equação IV.

$$EE\% = \left(\frac{Q_{teórica} - Q_{nãoencapsulada}}{Q_{teórica}} \right) \times 100 \quad \text{Equação IV}$$

Onde: *Qteórica* é a quantidade de OVA que teoricamente estaria presente em 1 mL da dispersão de lipossomas.

4.6.5. Eletroforese em gel

A integridade da OVA nas dispersões foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando uma unidade de eletroforese vertical Mini VE (GE Healthcare) (Figura 5).

Figura 5. Ilustração da unidade de eletroforese em gel. Fonte: http://www.exonbiotec.com.br/produtos/item/76/cuba_de_eletroforese_mini_ve.

Na presença de 20 µL do agente redutor beta mercaptoetanol e aquecimento a 95°C por 5 min, as proteínas presentes em 40 µL das amostras testadas foram dissociadas antes de serem aplicadas no gel. O tampão da cuba utilizado continha Tris (base) 0,0125 M, glicina 0,96 M, SDS 0,5% e água. Foi aplicada tensão elétrica de 125 V, intensidade da corrente elétrica de 90 mA, sendo o tempo da corrida de 1,5 h. Depois da eletroforese, o gel contendo as amostras foi descorado com uma solução de 7% de ácido acético em água e após, as bandas das proteínas foram detectadas pelo corante *Coomassie Brilliant Blue*. O marcador padrão continha proteínas com peso molecular de 14, 20, 30, 45, 66 e 97 kDa. As amostras aplicadas no gel de empilhamento foram: dispersão de OVA em tampão fosfato pH 7,4 0,01 M a 5 mg/mL, lipossoma aniônico branco, lipossoma aniônico contendo OVA a 5 mg/mL, lipossoma aniônico contendo OVA a 5,0 mg/mL e NPAg e dispersão aquosa de NPAg.

Já o estudo de integridade da OVA a partir dos lipossomas catiônicos foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conduzido nas mesmas condições descritas anteriormente. As amostras aplicadas no gel de empilhamento foram: solução salina contendo OVA a 100 $\mu\text{g/mL}$, lipossoma catiônico contendo 0,25 mg/mL de OVA, lipossoma contendo OVA a 0,25 mg/mL e NPAG e lipossoma catiônico contendo OVA a 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.6.6. Microscopia de força atômica (AFM)

Esses estudos foram realizados com a colaboração do Professor Marcelo A. Pereira da Silva, do laboratório de microscopia de força atômica - Instituto de Física de São Carlos, USP. A AFM produz imagens topográficas de superfícies atingindo resolução nanométrica. A Figura 6 representa um esquema de como o microscópio de força atômica gera a imagem.

Figura 6. Esquema do microscópio de força atômica (RODRIGUES, 2003).

O *cantilever* (haste) (Figura 6) varre a superfície da amostra com uma ponta de alguns micrômetros de comprimento e geralmente com menos de 20 nanômetros de diâmetro. A ponta está localizada na extremidade do *cantilever*, que possui um comprimento de 100 a 200 μm . As forças entre a ponta e a superfície da amostra fazem com que o *cantilever* se aproxime ou se afaste. Um fotodetector (fotodiodo) mede a deflexão do *cantilever* à medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta e com esses dados o computador gera as imagens (RODRIGUES, 2003).

O preparo da amostra, composta pela suspensão de lipossomas, foi realizado pelo método de automontagem, no qual ocorre o material em solução é adsorvido sobre a

superfície de um substrato sólido. Para a obtenção dos filmes automontados, o substrato de mica foi imerso na suspensão de lipossomas contendo 5,00 mg/mL de OVA e lipossomas contendo 5 mg/ml de OVA mais NPAg e deixados em repouso por 24 h para a secagem do material no substrato. Após esse período a amostra foi analisada no microscópio de força atômica (MultiMode Nanoscope 3a, Digital Instruments), modo de contato intermitente (*tapping mode*), sendo usado o software Nanoscope 3 v5.12b43 para o tratamento das imagens.

4.6.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Uma gota da suspensão dos lipossomas em estudo (aniônico e catiônico, na presença e ausência de NPAg) foi colocada em contato por 15 min com grades revestidas de carbono. Em seguida adicionou-se tetróxido de ósmio em solução aquosa a 2%; 10 min depois colocou-se 1% de acetato de uranila em meio aquoso e passado 1 min, realizou-se a secagem ao ar. As amostras foram observadas sob microscópio de transmissão eletrônico Jeol modelo 100CX II em ampliações que variaram de 50 K a 200 K (SAMANTA *et al.*, 2011; RUOZI *et al.* 2011).

4.7. Estabilidade física dos lipossomas

As dispersões de lipossomas aniônicos e catiônicos adicionados ou não de NPAg foram submetidas aos estudos de estabilidade. As formulação foram analisadas de acordo com tamanho médio, índice de polidispersividade, potencial zeta e valor de pH (item 4.6) após 24 horas de preparo, no 7º e 14 dias a temperatura ambiente.

4.7.1. Estabilidade dos lipossomas frente à aplicação da corrente elétrica

As formulações dos lipossomas aniônicos compostos por PC e DOPE, na proporção de 3:1, respectivamente, a 5 mg/mL de OVA e dos lipossomas catiônicos compostos por DMPC e DOTAP, na proporção de 1:1, respectivamente, e 0,25 mg/mL de OVA contendo ou não NPAg foram submetidas a corrente elétrica de 0,5 mA por 15 min. Para isso, 5 mL das formulações foram colocadas em dois béqueres separados e interconectados por uma ponte salina composta por agar e NaCl a 0,9% em água destilada. Eletrodos de Ag/AgCl foram colocados em contato com as formulações nos dois béqueres. Um desses eletrodos foi conectado ao pólo positivo e o outro ao pólo negativo da fonte de energia e a corrente elétrica

aplicada. Após 7 e 15 min do início do experimento foram coletadas alíquotas para análise do tamanho médio, PDI e medida de pH (item 4.6).

4.8. Estudos *in vitro* de permeação cutânea

4.8.1. Medida da resistividade elétrica da pele (R)

A medida de resistividade elétrica foi realizada nas peles que foram utilizadas como membrana nos experimentos de penetração para verificar se o EC das mesmas estava íntegro para uso nos experimentos (TANG *et al.*, 2001). Para isso, as peles foram montadas em células de difusão vertical tipo “Franz” e seu compartimento doador e receptor preenchido com tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. Para determinar a resistência conferida pelo EC a passagem de uma corrente elétrica, foi utilizado um gerador de sinal (modelo 33210A Agilent) e eletrodos de Ag/AgCl (*In Vivo Metrics*) inseridos no compartimento doador e receptor das células. O eletrodo em contato com o meio receptor foi ligado ao gerador de sinal e uma corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência foi aplicada. A corrente elétrica gerada foi então medida através de outro eletrodo inserido no compartimento doador ligado a um multímetro (Minipa ET 2053) (Figura 7), e a resistência da pele foi calculada utilizando-se a lei de Ohm. A resistência real da pele foi calculada subtraindo-se a resistência do sistema (sem a pele) do valor de resistência total. O valor de resistividade foi então obtido multiplicando-se o valor de resistência real pela área da pele disponível para permeação (1,13 cm²). As peles adequadas para uso, consideradas intactas, apresentaram valor de resistividade >50 KΩ.cm² (POLAT *et al.*, 2010).

Figura 7. Ilustração da medida da resistividade elétrica da pele (R) (HUBER, 2013).

4.8.2. Recuperação da OVA da pele

Uma amostra de pele de aproximadamente 1 cm² foi picotada, colocada em um tubo cônico de polipropileno estéril e adicionada de 50 µL de soluções de OVA em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 nas concentrações de 2,5, 3 e 4 ng/mL. O tubo com a pele foi deixado aberto

por 1 h para a evaporação do tampão, adicionado de 5 mL do tampão fosfato e deixado em repouso durante a noite. Após esse período, a dispersão foi filtrada para remoção da pele e a OVA quantificada no filtrado por ELISA (kit da Alpha Diagnostic, Texas, USA, número de catálogo 6050).

A porcentagem de OVA quantificada em relação à quantidade total adicionada foi considerada como sendo a porcentagem de recuperação.

Como controle foi feita uma curva analítica nas concentrações de 0,125 a 2 µg/mL de OVA como descrito no item 4.9.1.

4.8.3. Preparo dos eletrodos usados na iontoforese

Os eletrodos utilizados foram eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) obtidos conforme descrito por Lopez (2000). Resumidamente, para a obtenção do eletrodo negativo (cátodo), um fio de prata (99,9 % de pureza) com a ponta dobrada foi imerso em uma pequena quantidade de cloreto de prata fundido em cadinho, e então removido com a extremidade dobrada repleta de cloreto de prata solidificado. Para o preparo do eletrodo positivo (ânodo), foi montado um circuito elétrico em série contendo fios de platina e eletrodos de AgCl mergulhados dentro de uma solução salina de NaCl (5,78 M). Uma corrente de 0,4 mA foi passada pelos eletrodos por 8 h, saindo do terminal positivo ligado a platina e se ligando ao terminal negativo nos eletrodos de AgCl para que este fosse reduzido à Ag.

4.8.4. Iontoforese *in vitro*

Foram utilizadas células de difusão verticais tipo “Franz”, as quais apresentam o compartimento doador e o compartimento receptor. Os eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese *in vitro* da OVA foram os eletrodos de Ag e AgCl (item 4.8.3) (LOPEZ *et al.*, 2001, GREEN, 1991).

A célula de difusão foi montada com a pele separando os compartimentos doadores do compartimento receptor. Este último foi preenchido com uma solução de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 contendo 137 mM de NaCl. Na porção superior da célula foram adicionados 2 mL das formulações estudadas: dispersão de OVA em tampão fosfato (OVA-PBS), dispersão de lipossomas aniônicos, compostos por PC e DOPE na proporção de 3:1, respectivamente, contendo OVA a 5,0 mg/mL (OVA-lipossoma(-)), dispersão de lipossomas aniônicos contendo OVA a 5,0 mg/mL e NPAG (OVA-lipossoma(-) com NPAG), dispersão de lipossomas catiônicos, compostos por DMPC e DOTAP, na proporção de 1:1, contendo OVA

a 0,25 mg/mL (OVA-lipossoma(+)) e dispersão de lipossomas catiônicos contendo OVA a 0,25 mg/mL e NPAg (OVA-lipossoma(+)) com NPAg). Todas as formulações, tanto aniônicas como catiônicas foram submetidas à iontoforese anódica e apenas as formulações aniônicas foram submetidas à iontoforese catódica. Para a realização da iontoforese anódica, o eletrodo de Ag foi colocado em contato com a formulação, no compartimento doador, e no compartimento receptor foi colocado o eletrodo de AgCl. Já para a realização da iontoforese catódica, o eletrodo de AgCl foi colocado em contato com a formulação, no compartimento doador, e no compartimento receptor foi colocado o eletrodo de Ag. Estes eletrodos foram ligados a uma fonte de energia (Futron Data Controles Ltda, ACC200.2.20) e submetidos a uma corrente elétrica constante de 0,5 mA/cm² por 15 min. A variação de potencial (voltagem) necessária para manter a corrente constante em resposta à resistência da pele de porco foi monitorada com o auxílio de um multímetro. A solução receptora foi mantida a 37°C. As mesmas formulações também foram colocadas em contato com a pele pelo mesmo período de tempo (15 min) na ausência da iontoforese para se analisar a penetração passiva da OVA.

4.8.4.1. Determinação da OVA retida na pele

No final do experimento de iontoforese *in vitro*, a pele foi removida da célula de difusão e presa em uma superfície lisa com o EC voltado para cima. A parte da pele submetida à difusão foi então retirada através da técnica do “*tape stripping*” (item 4.8.4.2.). A pele sem EC (epiderme viável e derme), a partir de agora denominada “epiderme viável”, foi picotada, adicionada em um tubo cônico de polipropileno estéril, juntamente com tampão fosfato 10 mM pH 7,4 como solvente extrator da OVA e deixado durante a noite para a extração da proteína. Após esse período foram realizadas diluições seriadas com o objetivo de chegar a concentrações adequadas de OVA para sua quantificação por ELISA (item 4.9).

4.8.4.2. “Tape stripping”

O EC foi separado da “epiderme viável” utilizando-se 15 fitas adesivas. A remoção mais ou menos completa do EC após este procedimento foi indicada pelo “brilho” da face exposta da pele (epiderme viável). As 15 fitas adesivas contendo partes do EC foram colocadas conjuntamente em um tubo, e a OVA nelas contida foi extraída com 10 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 durante uma noite, seguido da quantificação da OVA por ELISA (item 4.9).

4.9. Quantificação da OVA por ELISA

Para a quantificação da OVA na “epiderme viável”, no EC e no meio receptor das células de difusão foi utilizado o Kit comercial da empresa Alpha Diagnostics (Texas, USA). Para isso, foram realizadas diluições seriadas.

O fundamento do kit é baseado na ligação de OVA proveniente do ovo a dois anticorpos; um imobilizado nos micropoços, e o outro conjugado com *horseradish* peroxidase (HRP). Após um passo de lavagem, o substrato cromogênico (TMB) é adicionado, gerando uma cor desenvolvida pela reação enzimática da HRP sobre o substrato, a qual é diretamente proporcional à quantidade de OVA presente na amostra. É adicionada uma solução para frear essa reação e a absorbância é lida a 450 nm em um leitor de microplacas de ELISA. A concentração de OVA nas amostras foi calculada a partir de uma curva de calibração preparada a partir de soluções padrões de OVA extraídas da pele (item 4.9.1).

Resumidamente o procedimento deu-se da seguinte forma: antes da adição das amostras, 200 µL de solução de lavagem foi adicionada aos poços e retirada após 5 min. Em seguida, 100 µL das amostras foram adicionadas aos poços e incubadas por 60 min. Após, a placa foi lavada 4 vezes com a solução de lavagem e secas em papel toalha para posterior adição de 100 µL por poço de anti-OVA-HRP conjugado, incubados por 60 min e depois lavados 5 vezes. Posteriormente foram adicionados 100 µL por poço de TMB substrato e esperado o aparecimento da coloração azul por 10 min, sendo que após esse período foram adicionados 100 µL da solução “stop” e a leitura de densidade óptica realizada em leitor de ELISA a 450 nm.

4.9.1. Curva de calibração da OVA em pele

Para o preparo da curva de calibração da OVA em pele fez-se uma solução mãe de OVA em tampão fosfato 0,01 M pH 7,4 na concentração de 10 mg/mL e a partir desta foram obtidas soluções nas concentrações de 25 a 400 µg/mL. Após, adicionou-se 50 µL das soluções em cada concentração em um tubo cônico de polipropileno estéril, contendo um pedaço de pele de tamanho semelhante à área da célula de difusão, 1,13 cm², deixados em contato por 1 h. Após esse período, 10 mL de tampão fosfato foram colocados nos tubos e deixados durante a noite, obtendo-se soluções nas concentrações de 0,125 a 2 µg/mL de OVA. Essas soluções foram filtradas e realizadas mais duas diluições com o objetivo de chegar a concentrações de 0,25 a 4 ng/mL, ou seja, chegar à faixa de leitura do kit comercial. Em seguida procedeu-se a quantificação da OVA por ELISA.

4.10. Experimentos de imunização *in vivo*

Essa parte do projeto contou com a colaboração da Prof^a Lúcia Helena Faccioli, da pós-doutoranda Claudia Bitencourt e de Denise S. C. da Silveira, todas da FCFRP-USP. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), número de protocolo 10.1.1052.53.9.

4.10.1. Imunização dos camundongos BALB/c e avaliação da resposta imune

Foram utilizados camundongos fêmeas de 8 a 12 semanas, de linhagem BALB/c. No estudo das formulações aniônicas, exceto o grupo de animais que recebeu a OVA livre a 100 µg/mL, os animais foram subdivididos em 2 grandes grupos: Grupo 1 - imunizado apenas no 1º dia e eutanasiado no 8º dia, Grupo 2 - imunizado no 1º, desafiado no 22º dia e eutanasiado no 36º dia. Para as demais formulações os animais receberam a imunização no 1º dia, foram desafiados no 22º dia e eutanasiados no 36º dia. As formulações estudadas estão demonstradas na Figura 8.

Figura 8. Representação esquemática dos grupos de animais utilizados nos experimentos de imunização *in vivo*.

Um dia antes da realização do experimento de imunização os pêlos da região abdominal dos camundongos foram removidos por tricotomia. A medida de resistividade da pele dos animais foi realizada antes e após a tricotomia para certificar-se que esse procedimento não alterava a integridade da mesma. Dessa forma, foi acoplado um *patch* de Ag na cauda dos animais, o qual foi ligado ao gerador de sinal e uma corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência foi aplicada. A corrente elétrica gerada foi então medida através do eletrodo de AgCl, o qual foi inserido em um compartimento de vidro, contendo tampão fosfato pH 7,4 0,01 M, colocado na região abdominal e ligado a um multímetro (Minipa ET 2053). A resistividade da pele foi calculada usando a Lei de Ohm. Somente os animais que apresentavam pele com uma resistividade inicial de 60 K Ω .cm² ou mais foram usadas, para assegurar que o EC estava íntegro antes dos experimentos (TEZEL *et al.*, 2005).

4.10.1.1. Tratamento

Minutos antes do estudo de iontoforese *in vivo*, cada animal foi anestesiado através da aplicação intraperitoneal da solução anestésica composta por xilazina e ketamina, 10 e 75 mg/Kg respectivamente. Sobre a área abdominal tricotomizada do animal anestesiado foi colocado um compartimento de vidro, de área 1,13 cm² e cerca de 2 mL das formulações a serem testadas foi colocado dentro do mesmo, entrando em contato com a pele do animal. Em contato com as formulações foi acoplado um eletrodo negativo de AgCl quando a iontoforese realizada foi a catódica. A cauda do animal foi envolvida por um *patch* desenvolvido pela IOMED ligado ao polo positivo da fonte de energia para fechar o circuito de passagem da corrente elétrica (Figura 9). Quando foi realizada a iontoforese anódica, o eletrodo de Ag foi colocado em contato com a formulação a ser estudada e conectado ao polo positivo da fonte de energia, sendo a cauda do animal envolvida por um *patch* desenvolvido pela IOMED conectado ao polo negativo da fonte de energia para fechar o circuito. A corrente elétrica aplicada foi de 0,5 mA/cm² por 15 min. A fonte de energia Futron Data Controles Ltda, ACC200.2.20 foi utilizada nos experimentos.

Figura 9. Fotografia representativa da imunização *in vivo* com a aplicação da iontoforese.

4.10.1.2. Dosagem de anticorpos anti-OVA

Nos dias padronizados os animais dos grupos 1 e 2 foram eutanasiados. Realizou-se a coleta de sangue e este foi mantido a temperatura ambiente por 1 h para a formação do coágulo. Após este período, as amostras foram submetidas à centrifugação durante 10 min a 1500 rpm para obtenção do soro. O soro dos animais foi aliqotado e armazenado em tubos de plástico de polipropileno a temperatura de -20 °C para posteriormente serem usados no experimento de dosagem de anticorpos anti-OVA. Anticorpos IgM, IgG1 e IgG2 anti-OVA foram determinados pelo método de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL/poço de OVA diluída em PBS (8,0 g de NaCl, 1,16 g de Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl, q. s. para 1 L) pH 7,4 na concentração de 10 µg/mL e incubadas em temperatura ambiente por uma noite. Após, foram realizadas três lavagens sendo duas com PBS contendo Tween[®] (0,5 mL de Tween[®] 20 em 1 L de PBS) e uma apenas com PBS. A seguir, adicionou-se tampão bloqueio (100 µL/poço de BSA a 5% em PBS), e as placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente e lavadas novamente. Amostras (50 µL) do soro dos animais, diluídas nas proporções de 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024, foram então adicionadas nas placas, as quais foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente. As placas foram lavadas, adicionadas de 100 µL dos anticorpos secundários biotinizado anti-IgM, anti-IgG1 e anti-IgG2 na concentração de 4 µg/ml, incubadas por mais 2 h a temperatura ambiente e lavadas. Em ambiente escuro, adicionou-se 100 µL/poço de estreptavidina diluída 1:200 em tampão bloqueio e após 20 min a placa foi lavada. Em seguida, foi adicionado o agente revelador (BD OptEIA™), na proporção 1:1, aguardado o aparecimento da coloração azulada e a reação foi interrompida com ácido H₂SO₄ 1 M. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 450 nm em leitor de microplaca de ELISA.

4.10.1.3. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Após a eutanásia, os animais foram colocados em decúbito dorsal para retirada do baço com auxílio de pinça estéril, após incisão abdominal. Os baços foram colocados em placa de petri estéril contendo 3 mL de meio RPMI-I e mantidos em banho de gelo. Em fluxo laminar, o órgão foi macerado com auxílio de peneira, o macerado foi transferido para tubo cônico de polipropileno estéril de 50 mL e submetido à centrifugação por 10 min a 1200 rpm. Após, foi adicionado à suspensão de células 10 mL de tampão de lise (cloreto de amônia 0,85% previamente aquecido a 37 °C) e o tubo incubado por 10 min a 37 °C para lise das hemácias. Adicionou-se 15 mL de RPMI-I e os tubos foram novamente centrifugados por 10 min a 1200 rpm. O *pellet* de células foi recuperado e ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI-C, contadas utilizando o método de exclusão por Tripan blue, e ajustadas para a condição de 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2 % de BSA por animal.

A expressão dos marcadores de superfície CD3, CD4, CD8, CD19, CD45RB e CD44 foram determinadas por citometria de fluxo utilizando anticorpos conjugados com fluorocromos (BD Biosciences, NJ, EUA). Após ajustar as células para a condição de 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2 % de BSA foi adicionado tampão bloqueio e as mesmas foram incubadas por 30 min a 4 °C. As células foram transferidas para tubos de FACS e adicionadas de 25 μ L de anticorpos conjugados com fluorocromos e incubadas por 45 min a 4 °C. A seguir foram lavadas com 2 mL de PBS contendo 2% de SBF (Soro Bovino Fetal) para a remoção do excesso de anticorpos, sedimentadas por centrifugação (10 min a 1200 rpm) e fixadas com 200 μ L de PBS contendo 1% de formol. O sistema foi mantido a 4 °C até o momento da aquisição dos dados no citômetro (FACSCanto TM; Becton Dickinson, CA, USA). Foram adquiridos 30000 eventos de cada amostra. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva.

4.10.2. Experimentos de reestimulação (OVA *recall*)

Os animais que receberam a aplicação tópica de lipossomas aniônicos contendo OVA associada à iontoforese anódica (LIP-OVA, n = 5), lipossomas aniônicos sem OVA associada à iontoforese anódica (BR, n = 5), 10 μ L da injeção subcutânea de lipossoma aniônico a 100 μ g/mL de OVA (Sub, n = 5) e animais naive, sem tratamento (Naive, n = 3), foram selecionados para verificar a resposta imune celular após reestimulação. Desta forma, após 36 dias da imunização, os animais foram sacrificados e os linfonodos inguinais e o baço foram removidos. Os órgãos foram macerados utilizando uma membrana (*cell strainer*) de tamanho

de poro de 80 μm . A suspensão celular obtida foi mantida em meio RPMI-C, suplementado com antibiótico e soro fetal bovino a 10%. As células foram centrifugadas a 400 g por 8 min à 4 °C, o sobrenadante desprezado e as células foram novamente ressuspensas em tampão de lise adequado. Mais uma vez a suspensão celular foi centrifugada (nas mesmas condições) e ressuspensa em meio RPMI-C, após a remoção do sobrenadante. A concentração de células foi determinada com auxílio de contador eletrônico (COULTER® AC T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA). Em seguida, $5,0 \times 10^6$ células foram separadas, ressuspensas em 1 mL de PBS estéril contendo o marcador fluorescente Alexa Fluor Dye- 647 (5 μM -eBioscience) e incubadas durante 15 min, à temperatura de 37°C. Após a incubação, a suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante removido, seguindo-se da adição de 10 mL de RPMI-C contendo 10% de soro bovino. As células foram novamente incubadas durante 15 min. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI-C e novamente centrifugadas. Este procedimento foi repetido por 3 vezes consecutivas com o objetivo de remover o marcador fluorescente não ligado às células.

As células foram então plaqueadas em placa de 96 poços de fundo em “U”, na densidade de $0,1 \times 10^6$ células por poço e, a seguir, estimuladas com ConA (concanavalin A) e OVA a 10, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Após 96 h, o sobrenadante da cultura celular foi removido para dosagem de citocinas e, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD4 conjugado ao fluorocromo. O decaimento da fluorescência do marcador Dye-647, por ocasião da proliferação, dentro da população de células CD4^+ , foi determinado com a utilização de citômetro de fluxo (BD FACS Verse).

4.10.2.1. Determinação de citocinas

As células do linfonodo inguinal e do baço foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo em “U”, na densidade de $0,1 \times 10^6$ células por poço e estimuladas com ConA, OVA a 10, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Após a incubação por 96 h a 37 °C, o sobrenadante da cultura celular foi removido para dosagem das citocinas IL-2, IL-17 e INF- γ .

A quantificação dos níveis de citocinas foi realizada utilizando os Kits DuoSet® de ELISA para as citocinas de camundongo determinadas, método sanduíche, segundo protocolo da R&D system. As placas de 96 poços foram preparadas pela adição de 100 μL /poço dos anticorpos de captura (para a determinação de INF- γ foi utilizado o anti- INF- γ , para a IL-2 o anti-IL-2 e para a IL-17 o anti-IL-17, todos na concentração de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ diluídos em PBS).

4.10.3. Estudo de recrutamento de células apresentadoras de antígenos

Os animais foram tratados com lipossoma aniônico contendo OVA FITC (0,5 mg/mL) associado à iontoforese catódica (n=4) e lipossoma aniônico branco, sem OVA FITC, associado à iontoforese catódica (n=4) e após três dias foram eutaniados. Uma suspensão celular proveniente dos linfonodos inguinais e do baço desses animais foi preparada colocando-os em tubo de polipropileno de 15 mL (Falcon[®]) contendo 1 mL de meio RPMI incompleto. Assim, os órgãos foram dissecados em peneira de propietileno (Falcon[®] - separador de células – 100 µm) com auxílio do êmbolo da seringa de 5 mL (Plastipak[®]), formando uma suspensão celular dos linfonodos inguinais e uma suspensão de células do baço. As hemácias foram lisadas por choque hiposmótico utilizando um tampão de lise e uma nova centrifugação foi realizada. Subsequentemente, as células do baço foram ressuspensas em 3, 2 e 1 mL de PBS contendo 2% de SBF inativado e contadas no contador automático (COULTER[®] AC T; Coulter Corporation, Miami, Florida, USA).

As células (1×10^6 células/tubo) foram incubadas com 40 µL de Fc block, bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas (anticorpo proveniente de sobrenadante de 14 hibridoma de anti-CD16/ CD32), para evitar ligações inespecíficas, por 20 min a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 1 µL de anticorpos CD11c PE (para células dendríticas) e MHC-II (APC), mantidos por 30 min a 4°C. Posteriormente as amostras foram lavadas 2 vezes com 2 mL de PBS contendo 2% de SBF, centrifugadas a 400 g por 10 min e ressuspensas em 100 µL de solução de formaldeído a 1% em PBS. Após estes procedimentos, os dados referentes as amostras foram adquiridos em FACScanto (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência 1 (FL1) para moléculas conjugadas a FITC; 2 (FL2) para moléculas conjugadas a PE e 4 (FL4) para moléculas conjugadas a APC ou Alexa Fluor 647. As análises foram feitas usando o programa FCS Express V3, o qual permite analisar todas as células adquiridas (30000 eventos/gate de células /amostra), individualizadas por janelas (Gates) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL). Os resultados foram expressos como porcentagem da expressão de marcadores (% de células MHC-II+/Fitc+ dentro de uma população de CD11c).

4.11. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por análises estatísticas de acordo com o teste *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5* com o objetivo

de comparar 3 grupos ou mais. Já para a comparação entre dois grupos foi utilizado o *unpaired t test, two tailed* ($P < 0,05$), também utilizando o software *GraphPad Prism 5*.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização de metodologia analítica para quantificação da OVA por espectrofotometria no UV/Vis

5.1.1. Determinação do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{MÁX}$) da OVA no UV/Vis

A varredura da solução de OVA a 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentou $\lambda_{MÁX}$ em 280 nm (Figura 10). Esse comprimento de onda foi então escolhido para a quantificação da OVA no espectrofotômetro UV/Vis.

Figura 10. Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução de OVA a 250 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato, pH 7,4.

5.1.2. Validação da metodologia analítica

A metodologia analítica para quantificação de OVA por espectrofotometria no UV/Vis proposta no presente trabalho foi validada com base nos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade. A curva analítica obtida a partir da análise em espectrofotômetro, a 280 nm, de uma solução de OVA em tampão fosfato na faixa de concentração de 100 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ está demonstrada na Figura 11.

Figura 11. Representação gráfica da curva analítica de uma solução de OVA em tampão fosfato na faixa de concentração de 100 a 1500 µg/mL ($\lambda_{MAX} = 280$ nm).

As Tabelas 3 e 4 mostram os valores de precisão e exatidão obtidos nos estudos intra e inter-dia, respectivamente.

Tabela 3. Análise da precisão e exatidão intra-dia.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração analisada (µg/mL)	Precisão ^a	Exatidão ^b
100	99,4 (±2,18)	2,2	0,6
500	476,5 (±0,82)	0,2	4,7
1000	951,8 (±1,43)	0,1	4,8

Os valores entre parênteses representam o desvio padrão de 3 determinações.

^a expressa como coeficiente de variação ($CV\% = \text{desv pad} / [] \text{ média } \times 100$).

^b expressa como erro relativo ($E\% = [] \text{ obtida } - [] \text{ teórica } / [] \text{ teórica } \times 100$).

Tabela 4. Análise da precisão e exatidão inter-dia.

Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração analisada (µg/mL)	Precisão ^a	Exatidão ^b
100	98,6 (±3,38)	3,4	1,4
500	476,0 (±1,89)	0,4	4,8
1000	950,7 (±1,26)	0,1	4,9

Os valores entre parênteses representam o desvio padrão de 3 determinações.

^a expressa como coeficiente de variação ($CV\% = \text{desv pad} / [] \text{ média } \times 100$).

^b expressa como erro relativo ($E\% = [] \text{ obtida } - [] \text{ teórica } / [] \text{ teórica } \times 100$).

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos da análise de sensibilidade do método analítico.

Tabela 5. Parâmetros obtidos por espectrofotometria UV/Vis ($\lambda = 280$ nm) para a análise da sensibilidade do método analítico para a OVA.

Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração analisada ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão ^a	Exatidão ^b
50	51,3 ($\pm 1,42$)	2,8	2,6
75	72,7 ($\pm 2,46$)	3,4	3,0
100	98,0 ($\pm 1,65$)	1,7	2,0

Os valores entre parênteses representam o desvio padrão de 3 determinações.

^a expressa como coeficiente de variação ($CV\% = \text{desv pad} / [] \text{ média} \times 100$).

^b expressa como erro relativo ($E\% = [] \text{ obtida} - [] \text{ teórica} / [] \text{ teórica} \times 100$).

Os espectros no UV/Vis dos componentes presentes nos lipossomas, especificamente dos fosfolipídios PC e DOPE isoladamente ou em associação, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ dissolvidos em clorofórmio apresentaram absorção no comprimento de onda da OVA, a qual tem absorção máxima em 280 nm. Esses resultados estão demonstrados na Figura 12.

Figura 12. Espectro de absorção do fosfolipídio PC na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizado em clorofórmio (A); espectro de absorção do fosfolipídio DOPE na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizado em clorofórmio (B); Espectro de absorção da mistura dos fosfolipídios DOPE e PC na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, solubilizada em clorofórmio (C).

Já a análise de dispersões lipossomais, formadas com esses lipídeos, ultracentrifugadas em dispositivo AMICON Ultra Ultracel 100 kDa, não apresentou interferência na quantificação da OVA em 280 nm. Desta forma, nos estudos para se verificar a eficiência de encapsulação (EE) da OVA nos lipossomas (item 4.6.4), a OVA foi quantificada apenas no ultrafiltrado e a EE determinada pela diferença entre a quantidade teórica de OVA adicionada para a obtenção dos lipossomas e a quantidade determinada no ultrafiltrado (Equação IV). Nos experimentos de permeação cutânea e imunização a OVA foi quantificada por ELISA (item 4.9).

5.2. Obtenção de lipossomas contendo OVA

Os primeiros lipossomas preparados foram compostos por PC e DOPE. Eles foram obtidos pelo método clássico de hidratação do filme lipídico, mas apresentaram grande polidispersividade. Para melhorar as características dos lipossomas obtidos pelo método clássico de hidratação do filme lipídico, o tamanho e o PdI de lipossomas compostos por PC, DOPE e OVA, na concentração de 5 mg/mL, foi avaliado em função do tempo de agitação no ultra-turrax® e de homogeneização no homogeneizador de alta pressão (Tabela 6).

Tabela 6. Tamanho médio e PdI dos lipossomas em função do tempo de dispersão nos equipamentos ultra-turrax e homogeneizador de alta pressão.

Equipamento	Condição	Tamanho médio (nm) (Desvio padrão)	PdI
Ultra Turrax®	5 min	322 ($\pm$ 39)	0,41 ($\pm$ 0,05)
	10 min	371 ($\pm$ 8)	0,29 ($\pm$ 0,11)
	15 min	403 ($\pm$ 45)	0,29 ($\pm$ 0,03)
	20 min	316 ($\pm$ 32)	0,38 ($\pm$ 0,05)
	30 min	369 ($\pm$ 38)	0,39 ($\pm$ 0,04)
Homogeneizador de alta pressão	1 ciclo	171 ($\pm$ 11)	0,28 ($\pm$ 0,01)
	2 ciclos	160 ($\pm$ 15)	0,26 ($\pm$ 0,02)
	4 ciclos	150 ($\pm$ 12)	0,25 ($\pm$ 0,02)
	6 ciclos	142 ($\pm$ 4)	0,24 ($\pm$ 0,02)
	8 ciclos	141 ($\pm$ 11)	0,24 ($\pm$ 0,02)
	10 ciclos	137 ($\pm$ 7)	0,25 ($\pm$ 0,01)

* Nesse estudo foi utilizado n= 3.

Dentre os valores de tamanho médio encontrados após a agitação em ultra-turrax[®], foi observada diferença significativa ($P < 0,05$, *One-way ANOVA*) apenas entre os valores encontrados após 5 e 15 min. Porém, todos os valores de tamanho médio obtidos após a agitação em ultra-turrax foram superiores aos obtidos após homogeneização no homogeneizador de alta pressão. Desta forma, a passagem da formulação por este equipamento reduziu significativamente ($P < 0,05$, *One-way ANOVA*) o tamanho das vesículas quando comparado aos lipossomas não submetidos a homogeneização em alta pressão. Considerando, no entanto, o número de ciclos de homogeneização no homogeneizador de alta pressão, o seu aumento não alterou significativamente o tamanho dos lipossomas.

Com relação aos valores de PDI, houve uma variação entre os valores obtidos no ultra-turrax[®] apenas quando o tempo de agitação aumentou de 5 para 10 min, resultando em diminuição significativa do PDI ($P < 0,05$, *One-way ANOVA*). Os diferentes ciclos de homogeneização no homogeneizador de alta pressão não resultaram em diferenças significativas no PDI.

Com base nesses resultados, inicialmente padronizou-se o preparo dos lipossomas em 5 min de agitação no ultra-turrax a 15000 rpm seguido de 1 ciclo no homogeneizador de alta pressão, a 1000 bar, utilizando a temperatura de 25 °C e submetendo a suspensão à filtração em membrana de 0,45 µm. Porém, após 48 h os lipossomas se mostraram instáveis, com aumento significativo do tamanho e do PDI para as dispersões tratadas por menos de 20 min no agitador e com menos de 10 ciclos no homogeneizador de alta pressão.

Dessa forma, padronizou-se o tempo de agitação no ultra-turrax a 15000 rpm por 20 min, seguido de 10 ciclos no homogeneizador de alta pressão. Seguindo esses parâmetros, os resultados de tamanho médio, PDI e potencial zeta das diversas formulações de lipossomas aniônicos contendo OVA, nas concentrações de 0,25 e 5 mg/mL, filtrados em membrana 0,45µm, estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Tamanho médio, PDI e potencial zeta das formulações de lipossomas aniônicos.

Formulação	OVA (mg/mL)	Tamanho médio (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
PC/DOPE/DOTAP 4:2:3	0,25	432	0,40	-15
PC/DOPE/DOTAP 4:2:3	5	323	0,44	-12
PC/DOPE 3:1	0,25	118	0,29	-22
PC/DOPE 3:1	5	123	0,26	-7
PC/PE 3:1	0,25	175	0,38	-10
PC/EPC-3 3:1	0,25	588	0,31	-10
PC/EPC-3 3:1	5	389	0,57	-10

Para verificar se as vesículas observadas na análise por espalhamento de luz dinâmico correspondiam aos lipossomas e não à agregados de OVA, foi adicionado Triton X-100 as dispersões com o objetivo de romper as vesículas (dissolver os lipídeos) e verificar novamente o tamanho das partículas presentes nessa dispersão de OVA (Figura 13).

Figura 13. Distribuição de tamanho das dispersões tratadas com Triton-X (A) lipossomas contendo OVA, (B) OVA a 5 mg/mL em tampão fosfato.

Pode-se observar na Figura 13 que a dispersão de lipossomas tratada com Triton-X (Figura 13-A) não apresentou vesículas na faixa de tamanho observada quando os lipossomas estavam intactos (100 a 500 nm – Tabela 7). Por outro lado, foi possível observar partículas de tamanho menores do que 10 nm, correspondentes, possivelmente, a agregados da OVA. Esses agregados foram confirmados com a análise de uma dispersão aquosa de OVA em tampão fosfato (Figura 13-B), na ausência de lipídeos, mas também diluída em Triton-X, que apresentou partículas em faixa de tamanho semelhante aos da dispersão de lipossomas

dissolvidos com o mesmo solvente. Confirmou-se, desta maneira, que as partículas presentes nos lipossomas contendo OVA (Tabela 7) correspondiam aos lipossomas e não a agregados de OVA.

Dentre as formulações de lipossomas aniônicos, as compostas pelo par de lipídios DOPE e PC, tanto na concentração de OVA a 0,25 mg/mL como na de 5 mg/mL apresentaram valores satisfatórios de tamanho, PdI e potencial zeta.

Quanto ao índice de polidispersividade (PdI), os lipossomas compostos por PC/DOPE apresentaram PdI médio de 0,294 ($\pm 0,002$) e 0,257 ($\pm 0,002$) para o lipossoma contendo 0,25 e 5 mg/mL de OVA, respectivamente. Esses resultados indicam pouca variação de tamanho das vesículas lipossomais, ou seja, boa qualidade de distribuição do tamanho do sistema estudado.

Os lipossomas de 0,25 e 5 mg/mL de OVA e o lipossoma branco, sem a proteína, apresentaram potencial zeta negativo de -22 (± 2), -7,5 ($\pm 0,9$) e -27 ($\pm 7,5$) mV, respectivamente.

Com relação aos lipossomas catiônicos, os valores de tamanho médio, PdI e potencial zeta das diferentes formulações estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Tamanho médio, PdI e potencial zeta das formulações de lipossomas catiônicos.

Formulação	OVA (mg/mL)	Tamanho médio (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
PC/DOTAP 1:1	0,25	122	0,69	-0,7
PC/DOTAP 1:1	5	688	0,86	+26
PC/DOTAP 3:1	0,25	663	0,25	+28
PC/DOTAP 3:1	5	361	0,56	-11
PC/ Colesterol/DOTAP 3:4:3	0,25	2749	0,20	+31
DMPC/DOTAP 1:1	0,25	262	0,27	+41
DMPC/DOTAP 1:1	5	320	0,54	+37
DMPC/DOTAP 2:1	0,25	163	0,69	+35
DOTAP	0,25	440	0,40	-5
DOTAP	5	344	0,34	-4

Inicialmente foi usada a concentração de 0,25 mg/mL da OVA para verificar se resultava em um sistema estável. A concentração de 5 mg/mL foi incorporada para efeito

comparativo com os lipossomas aniônicos. Os resultados obtidos não mostram, no entanto, uma relação entre concentração, tamanho e PdI dependente da concentração de OVA ou de DOTAP.

A maioria dos lipossomas preparados com a mistura de lipídios descrita na Tabela 2 não apresentou características físico-químicas desejáveis, uma vez que muitas das formulações estudadas apresentaram potencial zeta negativo e outras apresentaram tamanho médio grande e PdI acima de 0,3 (Tabela 8). A formulação de lipossomas composta por DMPC e DOTAP, na proporção 1:1, contendo 0,25 mg/mL de OVA foi a que apresentou características mais adequadas, com tamanho médio abaixo de 300 nm, potencial zeta positivo e PdI abaixo de 0,3 (Tabela 8). Porém, não foi possível preparar lipossomas estáveis com esta mistura de lipídios com a adição de 5 mg/mL de OVA, pois os mesmos apresentaram-se muito polidispersos ($PdI > 0,5$). Desta forma, lipossomas catiônicos compostos por DMPC/DOTAP na proporção de 1:1 contendo 0,25 mg/mL de OVA foram os selecionados para os estudos subsequentes.

A Tabela 9 apresenta um resumo da composição e características físico-químicas das dispersões selecionadas para os estudos *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 9. Tamanho, PdI e potencial zeta das dispersões utilizadas nos estudos *in vitro* e *in vivo*.

Dispersão	Tamanho (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
Lipossoma (-)	183 ±18	0,30 ±0,01	-27 ±7
Lipossoma (-) OVA	124 ±9	0,26 ±0,02	-7 ±1
Lipossoma (+)	94 ±5	0,4 ±0,02	+47 ±3
Lipossoma (+) OVA	262 ±7	0,26 ±0,02	+41 ±6

A dispersão de OVA em PBS apresentou potencial zeta de -21 mV

5.2.1. Nanopartículas metálicas de Prata (NPAg)

Os resultados de tamanho médio, e PdI da dispersão de NPAg assim como seu espectro de absorção na região UV/vis do espectrofotômetro encontram-se apresentados na Figura 14.

Figura 14. Distribuição de tamanho e PdI da dispersão de NP Ag (A) e espectro de absorção UV/Vis da NP Ag (B).

O tamanho médio da dispersão de NP Ag foi de 20 ± 5 nm e o potencial zeta de $-8,4 (\pm 0,4)$ mV. As dispersões apresentaram ainda pico de maior absorção no espectro de absorção no UV/Vis em 399 nm (Figura 14-B), como esperado e descrito na literatura por Creighton e colaboradores (1979) para NP Ag.

As NP Ag obtidas foram então incorporadas aos lipossomas aniônicos e catiônicos resultando em dispersões com características físico-químicas apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Tamanho, PdI e potencial zeta de lipossomas contendo OVA acrescidos ou não de NP Ag.

Dispersão	Tamanho (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
Lipossoma (-) OVA	124 ± 9	$0,26 \pm 0,02$	$-7,5 \pm 0,9$
Lipossoma (-) OVA- NP Ag	128 ± 3	$0,26 \pm 0,02$	$-14 \pm 0,2$
Lipossoma (+) OVA	262 ± 7	$0,26 \pm 0,02$	$+41 \pm 6$
Lipossoma (+) OVA-NP Ag	271 ± 7	$0,26 \pm 0,01$	$+36 \pm 10$

A adição de NP Ag aos lipossomas não promoveu aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$, t-test) no tamanho médio, tanto no sistema aniônico como no catiônico.

Com relação ao potencial zeta, a presença das NPAg não alterou o potencial zeta das dispersões catiônicas, mas aumentou significativamente o potencial zeta das aniônicas.

5.2.2. Eficiência de encapsulação (EE%)

Os resultados de EE estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Quantidade de OVA encapsulada nos lipossomas aniônicos e catiônicos adicionados ou não de NPAg.

Formulação	EE (%)
Lipossoma aniônico OVA	78,4 ($\pm 2,97$)
Lipossoma aniônico OVA-NPAg	78,8 ($\pm 3,56$)
Lipossoma catiônico OVA	83,08 ($\pm 5,05$)
Lipossoma (+) OVA-NPAg	92,02 ($\pm 8,21$)

Salienta-se que os experimentos *in vivo* foram realizados com a dispersão de lipossomas contendo tanto OVA livre como encapsulada, para não incorrer em erros de concentração total de OVA administrada nas diferentes formulações.

5.2.3. Eletroforese gel

As Figuras 15 e 16 mostram as bandas apresentadas pelas amostras de lipossomas aniônicos e catiônicos, respectivamente, submetidos à eletroforese em gel.

Figura 15. Eletroforese gel da OVA em solução e incorporada aos lipossomas aniônicos.

Figura 16. Eletroforese gel da OVA em solução e incorporada aos lipossomas catiônicos. Coluna 1: substância padrão, com PM conhecidos; colunas 2 e 3: lipossoma contendo 0,25 mg/mL OVA, colunas 4 e 5: lipossoma contendo 0,1 mg/mL de OVA, colunas 6 e 7: lipossomas contendo 0,25 mg/mL OVA e NPAg, colunas 8 e 9: solução salina de OVA a 0,1 mg/mL.

A OVA apresenta duas bandas características de peso molecular de 40 e 45 kDa (LI *et al.*, 2011-B). Essas duas bandas podem ser claramente observadas nas Figuras 15 e 16 em todas as formulações que continham OVA. Além disso, peptídeos de baixo peso molecular, característicos de OVA degradada, não foram observados nas placas submetidas a eletroforese. Esses resultados sugerem que a estratégia utilizada para preparar as dispersões lipossomais não prejudicou a integridade da proteína.

5.2.4. Microscopia de força atômica (AFM)

A imagem da distribuição dos lipossomas aniônicos contendo 5 mg/mL de OVA analisadas por AFM encontra-se na Figura 17. O tamanho máximo das vesículas analisadas foi de 105,7 nm, um valor um pouco menor se comparado com o obtido pelo DLS (tabela 9).

Figura 17. Imagem de AFM do lipossoma aniônico.

A dispersão de NPAg também foi analisada por microscopia de força atômica, após o preparo, antes da adição aos lipossomas (Figura 18 A). O maior tamanho encontrado foi de 20,6 nm. A análise dos lipossomas aniônicos contendo NPAg (Figura 18 B) mostra claramente os lipossomas, dificultando a visualização das NPAg (presentes em baixa concentração nos lipossomas). Os lipossomas aniônicos contendo NPAg apresentaram tamanho médio de 142 nm. Pode-se observar na Figura 18 B áreas de agregação das vesículas causadas, provavelmente, pela deposição dos lipossomas na mica e do aquecimento da dispersão durante a análise.

Figura 18. Imagens de AFM da dispersão de NPAg (A) e do lipossoma aniônico contendo NPAg (B).

A Figura 19 A mostra a análise por AFM dos lipossomas catiônicos. Foram encontradas vesículas de 40 até agregados de 700 nm, ou seja, apresentaram grande polidispersividade, o que pode ser decorrente da técnica de deposição do material no substrato de mica. Quando a dispersão de NPAg foi adicionada aos lipossomas o valor máximo foi de 600 nm, devido à presença de agregados (Figura 19 B). Neste caso, observa-se ainda uma

dispersão menos polidispersa, com tamanho de partículas variando de 30 a 200 nm, com a presença de alguns agregados.

Figura 19. Imagem do lipossoma catiônico gerada através do AFM: (A) lipossoma catiônico e (B) lipossoma catiônico contendo NPAg (B).

Em todas as formulações analisadas através do AFM, foram visualizadas regiões com coloração branca mais intensa à qual se referem às partículas de tamanho maior, que podem ser agregados de partículas, uma vez que elas tendem a fundir umas com as outras no substrato. Também comparando os resultados do DLS com a microscopia de força atômica houve um aumento no tamanho médio em todas as formulações.

As propriedades viscoelásticas dos lipossomas aniônicos também foram analisadas por AFM (Figura 20). Nesse teste, o *cantilever* se aproxima da superfície da amostra a uma velocidade prescrita e mantém uma profundidade de penetração durante um tempo especificado. A resposta da superfície dos lipossomas a esse movimento brusco da ponta do AFM em direção a amostra é interpretada como comportamento viscoelástico do sistema. Esse tipo de análise permitiu visualizar detalhes da amostra, como a membrana dos lipossomas, mostradas em branco na Figura 20 B, uma vez que diferencia visualmente os constituintes do sistema através da diferença de coloração da imagem.

Figura 20. Imagem de AFM das características viscoelásticas dos lipossomas. (A) campo escolhido para o estudo da propriedade viscoelástica, (B) detalhes da amostra.

5.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão foi capaz de mostrar a formação das vesículas lipossomais em todas as amostras analisadas. A Figura 21 se refere aos lipossomas aniônicos contendo OVA. Na imagem com aumento de 100 K (Figura 21 A) é possível observar vesículas lipossomais de tamanho heterogêneo, sendo que tal resultado pode corroborar com o índice de polidispersividade desses lipossomas que foi de 0,260. Também existem áreas de agregação dos lipossomas, as quais podem ser ocasionadas pela deposição do material na grade revestida de carbono. A Figura 21 B mostra as vesículas com aumento de 200 K.

Figura 21. Imagem dos lipossomas aniônicos gerada pelo microscópio eletrônico de transmissão; aumento de 100 K (A) e aumento de 200 K (B).

A Figura 22 mostra a análise dos lipossomas aniônicos contendo OVA e NPAg. Nela também pode ser observada variação de tamanho das vesículas lipossomais, porém não foi possível observar as NPAg nessas dispersões.

Figura 22. Imagem dos lipossomas aniônicos adicionados de NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 100K (A) e aumento de 200 K (B).

A microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas catiônicos contendo OVA (Figura 23) mostrou a presença de vesículas lipossomais com formato mais esférico quando comparado com as vesículas dos lipossomas aniônicos (Figura 20), sendo perceptível o depósito do corante em volta das vesículas, bem como regiões de agregação das mesmas (Figura 23 B).

Figura 23. Imagem dos lipossomas catiônicos gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 100K (A e B).

Quando foi adicionado NPAg aos lipossomas catiônicos, as vesículas apresentaram diferença no contraste das imagens com uma coloração mais acinzentada (Figura 24), o que pode ser ocasionada pela presença da NPAg nas vesículas.

Figura 24. Imagem dos lipossomas catiônicos adicionados de NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 100 K (A) e aumento de 200 K (B).

Como não foi possível verificar as NPAg nas amostras das formulações de lipossomas aniônicos e catiônicos tratados com acetato de uranila, optou-se em realizar a análise dessas formulações sem a adição desse agente de contraste. Dessa forma, foi possível visualizar as NPAg nos lipossomas aniônicos e catiônicos (Figuras 25 e 26).

Na dispersão de lipossomas aniônicos a prata parece distribuída no meio aquoso externo das vesículas lipossomais (Figura 25)

Figura 25. Imagem da dispersão dos lipossomas aniônicos e NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 50 K (A) e aumento de 100 K (B). As setas apontam para as NPAg.

Já na dispersão de lipossomas catiônicos, as NPAg aparecem sobrespostas às vesículas lipossomais, o que pode indicar interação dessas nanopartículas com os fosfolípidos da membrana dos lipossomas (Figura 26).

Figura 26. Imagem da dispersão de lipossomas catiônicos adicionados de NPAg gerada pela microscopia eletrônica de transmissão; aumento de 50K (A) e aumento de 100K (B). As setas apontam para as NPAg.

5.3. Estabilidade física dos lipossomas

As Tabelas 12 e 13 mostram os resultados referentes ao estudo de estabilidade física das dispersões lipossomais avaliada por até 14 dias a temperatura ambiente.

Tabela 12. Estabilidade física dos lipossomas aniônicos, na ausência e presença de NPAg, a temperatura ambiente em função do tempo.

Parâmetro	PC/DOPE 3:1 com OVA por:			PC/DOPE 3:1 com OVA e NPAg por:		
	1 dias	7 dias	14 dias	1 dias	7 dias	14 dias
Tamanho (nm)	129,4	132,1	130,3	129,5	135,3*	136,3*
	(±1,8)	(±1,9)	(±2,3)	(±0,9)	(±1,6)	(±2,6)
PdI	0,26	0,27	0,29	0,26	0,28	0,29
	(±0,02)	(±0,01)	(±0,02)	(±0,01)	(±0,01)	(±0,01)
Pot. zeta (mV)*	-7,8	-10,2	-11,7*	-14,7	-17,0	-17,7*
	(±0,27)	(±0,39)	(±0,72)	(±0,49)	(±1,37)	(±1,39)
pH	7,3	7,0	7,1	7,2	7,2	7,1
	(±0,04)	(±0,1)	(±0,2)	(±0,04)	(±0,04)	(±0,03)

* Potencial zeta. Valores significativamente diferentes em relação ao tempo inicial de experimento (P<0,05)

Tabela 13. Estabilidade física dos lipossomas catiônicos, na ausência e presença de NPAg, a temperatura ambiente em função do tempo.

Parâmetro	DMPC/DOTAP 1:1 com OVA			DMPC/DOTAP 1:1 com OVA e NPAg		
	por			por:		
	1 dias	7 dias	14 dias	1 dias	7 dias	14 dias
Tamanho (nm)	261,2	283*	290,3*	272,1	297,7*	310,4*
	(± 5,82)	(± 5,85)	(±2,38)	(±4,32)	(±4,70)	(±6,54)
PdI	0,28	0,46*	0,52*	0,27	0,37*	0,47*
	(±0,02)	(±0,01)	(±0,01)	(±0,01)	(±0,02)	(±0,03)
Pot. zeta (mV)*	+39,6	+24,6*	+19,5*	+37,5	26,2	24,7*
	(±1,51)	(±2,52)	(±1,11)	(±5,58)	(±2,44)	(±1,78)
pH	7,1	7,1	7,0	7,02	6,97	6,90
	(±0,03)	(±0,06)	(±0,06)	(±0,03)	(±0,09)	(±0,10)

* Potencial zeta. Valores significativamente diferentes em relação ao tempo inicial de experimento (P<0,05)

Os lipossomas aniônicos se mostraram estáveis com relação ao tamanho médio, quando submetidos a temperatura ambiente, durante o período de 14 dias; já os lipossomas aniônicos adicionados de NPAg apresentaram uma pequena elevação (ANOVA, $p < 0,05$) no tamanho médio após 7 e 14 dias de preparo (Tabela 12).

Porém com relação ao PDI, ambas as formulações aniônicas, adicionadas ou não de NPAG não sofreram alteração nos valores. Com relação ao potencial zeta dos lipossomas aniônicos, ambas as formulações apresentaram variação nos valores de potencial zeta no 14º dia de estudo (ANOVA, $p < 0,05$), sendo que os lipossomas sem a presença de NPAG passaram de -7,85 mV no 1º dia para -11,67 mV no 14º dia do estudo (Tabela 12). Já os lipossomas adicionados de NPAG passaram de -14,73 mV no 1º dia para -17,67 mV no 14º dia de estudo (Tabela 12).

Os valores de pH não apresentaram alteração para as formulações aniônicas durante o tempo de estudo (Tabela 12).

Com relação à estabilidade dos lipossomas catiônicos, ambas as formulações sem NPAG e na presença de NPAG (Tabela 13) apresentaram aumento no tamanho médio das vesículas lipossomais (ANOVA, $p < 0,05$). O PDI dos lipossomas catiônicos também aumentou e houve diminuição do potencial zeta em função do tempo de armazenamento (Tabela 13). A diminuição do potencial zeta foi maior nos lipossomas catiônicos que não continham NPAG. Já com relação aos valores de pH, ambas as formulações não sofreram alteração durante os 14 dias de estudo (ANOVA $p > 0,05$).

Desta forma, o estudo de estabilidade física dos lipossomas aniônicos e catiônicos não indicou, de maneira geral, o aumento da estabilidade quando as NPAGs foram adicionadas às formulações. Assim, para os estudos *in vitro* e *in vivo* as dispersões foram utilizadas 24 h após seu preparo.

As Tabelas 14 e 15 mostram os resultados obtidos do estudo de estabilidade física dos lipossomas aniônicos e catiônicos, respectivamente, submetidos à corrente elétrica de 0,5 mA por até 15 min.

Tabela 14. Estabilidade física dos lipossomas aniônicos, na ausência e presença de NPAg, frente a corrente elétrica de 0,5 mA.

Parâmetro	0,5 mA sobre PC/DOPE 3:1 com OVA por:			0,5 mA sobre PC/DOPE 3:1 com OVA e NPAg por:		
	0 min	7 min	15 min	0 min	7 min	15 min
Tamanho	130,5	135,0	135,3	156,5	159,2	159,8
(nm)	($\pm 2,5$)	($\pm 1,6$)	($\pm 2,2$)	($\pm 1,1$)	($\pm 2,0$)	($\pm 2,6$)
PdI	0,32	0,29	0,3	0,28	0,27	0,27
	($\pm 0,04$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,02$)	($\pm 0,00$)	($\pm 0,01$)	($\pm 0,01$)
Pot. zeta	-8,1	-8,4	-8,2	-13,8	-14,8	-13,4
(mV)*	($\pm 1,0$)	($\pm 1,0$)	($\pm 1,2$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,2$)	($\pm 0,7$)
pH	7,35	-	7,28	7,25	-	7,23
	($\pm 0,03$)		($\pm 0,02$)	($\pm 0,04$)		($\pm 0,04$)

* Potencial zeta

Tabela 15. Estabilidade física dos lipossomas catiônicos, na ausência e presença de NPAg, frente a corrente elétrica de 0,5 mA.

Parâmetro	0,5 mA sobre DMPC/DOTAP 1:1 OVA por:			0,5 mA sobre DMPC/DOTAP 1:1 OVA e NPAg por:		
	0 min	7 min	15 min	0 min	7 min	15 min
Tamanho	173,6	172,7	176,3	206,1	210,3	221,2
(nm)	($\pm 7,1$)	($\pm 6,3$)	($\pm 8,2$)	($\pm 8,3$)	($\pm 7,0$)	($\pm 9,4$)
PdI	0,27	0,30	0,31	0,24	0,26	0,26
	($\pm 0,06$)	($\pm 0,05$)	($\pm 0,05$)	($\pm 0,05$)	($\pm 0,05$)	($\pm 0,05$)
Pot. zeta	+43,9	+45,3	+47,4	+42,0	+45,6	+47,2
(mV)*	($\pm 0,7$)	($\pm 1,1$)	($\pm 1,6$)*	($\pm 0,9$)	($\pm 0,8$)*	($\pm 0,6$)*
pH	7,28	-	7,24	7,25	-	7,23
	($\pm 0,02$)		($\pm 0,02$)	($\pm 0,05$)		($\pm 0,05$)

* Potencial zeta. Valores significativamente diferentes em relação ao tempo inicial de experimento ($P < 0,05$)

A aplicação de 15 min de corrente elétrica a 0,5 mA, a mesma aplicada nos estudos *in vitro* e *in vivo*, não alterou significativamente o tamanho, o PdI e o pH das dispersões (Tabelas 14 e 15). O potencial zeta, no entanto, variou significativamente nos lipossomas catiônicos, tanto na presença como na ausência das NPAg (Tabela 15).

5.4. Estudos *in vitro* de permeação cutânea

Para quantificar a OVA na pele foi realizado o estudo de recuperação na pele, o qual apresentou mais de 89% da proteína recuperada para as concentrações estudadas, e mostrou que a pele quando analisada por ELISA a 450 nm não apresentava interferência dos seus componentes. A Figura 27 mostra a curva de calibração da OVA na presença da pele.

Figura 27. Representação gráfica da curva analítica da OVA na presença da pele na faixa de concentração de 0,5 a 4 ng/mL a 450 nm.

O Kit comercial para a quantificação da OVA é específico para a quantificação da OVA proveniente do ovo branco, não sendo quantificada albumina nativa da pele. A faixa de concentração escolhida baseou-se nos limites de quantificação do Kit, sendo que para valores abaixo de 0,5 ng/mL não foi obtido linearidade. Assim, o método proposto apresentou-se linear em toda a faixa de concentração estudada (0,5 a 4 ng/mL).

A Figura 28 mostra os resultados de permeação passiva e iontoforética da OVA livre, dispersa em tampão fosfato a 5 mg/mL.

Figura 28. OVA recuperada do EC e da epiderme viável a partir da dispersão de OVA em tampão fosfato pH 7,4 a 5 mg/mL. Os asteriscos (*) referem-se a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$) e EC refere-se ao estrato córneo.

Observa-se na Figura 28 que a iontoforese aumentou significativamente ($P < 0,05$) a penetração da OVA em todas as camadas da pele, quando comparada com a penetração passiva. As quantidades de antígeno penetradas por iontoforese anódica e catódica não foram significativamente diferentes e foram semelhantes no EC e na epiderme viável, sugerindo uma baixa interação da OVA com o EC. Ainda, quantidades pequenas, e semelhantes, de OVA foram encontradas na solução receptora após a iontoforese.

A Figura 29 mostra os resultados obtidos do estudo de penetração da OVA a partir dos lipossomas aniônicos no EC e na epiderme viável.

Figura 29. OVA permeada passivamente e por iontoforese no (A) EC e (B) epiderme viável a partir dos lipossomas aniônicos contendo OVA a 5mg/mL na ausência e presença de NPAG. Os asteriscos (*) referem-se a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$) e EC refere-se ao estrato córneo.

A encapsulação da OVA aos lipossomas (Figura 29) diminuiu a **penetração passiva** do antígeno quando comparado a OVA livre (Figura 28) no período de experimento, mas aumentou a quantidade penetrada por **iontoforese**. Por exemplo, a quantidade de OVA encontrada na epiderme viável após iontoforese anódica dos lipossomas (Figura 29 B) foi 2 vezes maior do que aquela encontrada nesta mesma região da pele após iontoforese anódica da OVA livre (Figura 28). A adição de NPAG aos lipossomas aumentou ainda mais esta penetração; 3 vezes mais.

Comparando-se os resultados obtidos com os lipossomas aniônicos entre eles, pode-se observar na Figura 29 que a iontoforese mais uma vez aumentou a penetração da OVA em relação à administração passiva, como esperado. A presença da NPAG diminuiu a quantidade de fármaco que penetrou passivamente na epiderme viável quando comparada com a quantidade encontrada aí após administração do lipossoma sem NPAG. No entanto, a iontoforese dos lipossomas que continham NPAG resultou em quantidades maiores de OVA na epiderme viável do que a iontoforese dos lipossomas que não continham NPAG: na iontoforese anódica, esse aumento foi de 1,4 vezes e na iontoforese catódica foi de 1,9 vezes (Figura 29 B).

Os resultados da permeação passiva e iontoforética da OVA a partir dos lipossomas catiônicos estão demonstrados na Figura 30.

Figura 30. OVA penetrada passivamente e por iontoforese após administração tópica dos lipossomas catiônicos contendo OVA a 0,25 mg/mL na presença e ausência de NPAG. (A) EC e (B) epiderme viável. Os asteriscos (*) referem-se a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$) e EC refere-se ao estrato córneo.

Novamente, a iontoforese aumentou a penetração da OVA, no entanto, diferente do observado na iontoforese dos lipossomas aniônicos, a presença da NPAG diminuiu a quantidade de OVA penetrada em relação a iontoforese anódica sem NPAG. Pode-se observar na Figura 30 que 4 vezes menos OVA foi encontrada na epiderme viável após a iontoforese dos lipossomas com NPAG em relação a iontoforese dos lipossomas sem NPAG. As NPAG também diminuíram a penetração passiva da OVA encapsulada.

Pode-se observar também na Figura 30 que a quantidade de OVA liberada é menor quando comparada com as quantidades liberadas a partir dos lipossomas aniônicos (Figura 29) e OVA livre (Figura 28). Isso acontece porque a quantidade de OVA presente nas formulações catiônicas é 20 vezes menor, ou seja, essas formulações continham 0,25 mg/mL de OVA enquanto as demais continham 5 mg/mL.

A Tabela 16 mostra o coeficiente de penetração da OVA na epiderme viável a partir das formulações administradas por iontoforese.

Tabela 16. Coeficiente de penetração da OVA na epiderme viável a partir das formulações administradas por iontoforese.

Formulações contendo OVA	OVA na epiderme viável ($\times 10^{-5}$ cm/min)	
	Iontoforese anódica	Iontoforese catódica
Tampão fosfato	2,35	1,87
Lipossoma aniônico	5,19	3,15
Lipossoma aniônico com NPAg	7,19	6,15
Lipossoma catiônico	3,2	-
Lipossoma catiônico com NPAg	0,8	-

Pode-se observar na Tabela 16 que a iontoforese dos lipossomas aniônicos foi a estratégia que mais aumentou a penetração da OVA na epiderme viável. A presença das NPAg nesses lipossomas aumentou o coeficiente de penetração da OVA.

5.5. Experimentos de imunização *in vivo*

5.5.1. Dosagem de anticorpos anti-OVA

A Figura 31 mostra os títulos de IgG1 anti-OVA produzidos após uma única imunização (A) e duas imunizações (B) realizadas com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos, contendo ou não NPAg, na presença e ausência da iontoforese.

Figura 31. Título de anticorpo IgG1 anti-OVA produzido após tratamento com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos. (A) Após uma imunização. (B) Após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$) em relação ao controle positivo (SC OVA). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese.

Após uma única imunização, os grupos de animais estudados não apresentaram diferença estatística significativa nos títulos de anticorpos IgG1 anti-OVA com relação aos grupos controle positivo e negativo, todos com níveis baixos de IgG1 (Figura 31A). Após a segunda imunização (Figura 31B), a administração da OVA subcutânea (SC OVA), controle positivo, desencadeou a resposta imune esperada. Mais ainda, os grupos submetidos à iontoforese que continham OVA, com exceção da iontoforese anódica da OVA livre, apresentaram títulos de anticorpos IgG1 semelhantes aos do controle positivo (Figura 31B).

A Figura 32 mostra os títulos de IgG2a anti-OVA produzidos após uma única imunização (A) e duas imunizações (B) realizadas com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos, contendo ou não NPAg, na presença e ausência da iontoforese

Figura 32. Título de anticorpo IgG2a anti-OVA produzido após tratamento com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos. (A) Após uma imunização. (B) Após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese.

Para os títulos de IgG2a (Figura 32), após uma imunização (Figura 32A) a administração da OVA por iontoforese catódica apresentou títulos de anticorpos maiores do que o controle positivo, mas após a segunda imunização, apenas o grupo controle positivo apresentou títulos de anticorpos altos (Figura 32B).

A Figura 33 mostra os títulos de IgM produzidos após uma única imunização (A) e duas imunizações (B) realizadas com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos, contendo ou não NPag, na presença e ausência da iontoforese.

Figura 33. Título de anticorpo IgM anti-OVA produzidos após tratamento com a OVA livre e com os lipossomas aniônicos. (A) Após uma imunização. (B) Após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese.

Com relação aos títulos de anticorpos IgM anti-OVA, de uma maneira geral, os níveis mantiveram-se baixo após a primeira e segunda imunização, para todas as formulações estudadas. Salienta-se que, dos grupos submetidos a iontoforese, os títulos de IgM não foram determinados após iontoforese anódica e após tratamento com os lipossomas catiônicos porque já apresentaram-se muito baixos em todos os outros grupos, inclusive no controle positivo.

Os resultados referentes aos tratamentos realizados com os lipossomas catiônicos encontram-se nas Figuras 34 e 35 que mostram, respectivamente, os títulos de IgG1 e IgG2 anti-OVA produzidos após duas imunizações realizadas com os lipossomas catiônicos, contendo ou não NPAg, na presença e ausência da iontoforese. Os títulos de anticorpos produzidos após iontoforese catódica de uma dispersão de OVA livre na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ também foram avaliados. Como os resultados de títulos de anticorpos após a primeira imunização não demonstraram diferença estatística significativa quando comparados com o grupo controle negativo, optou-se por realizar a dosagem de anticorpos após estes experimentos apenas após a segunda imunização dos camundongos BALB/c.

Figura 34. Título de anticorpo IgG1 anti-OVA produzido após tratamento com os lipossomas catiônicos e com iontoforese da OVA livre a 100 µg/mL, após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média $\pm$ DP, n= 5. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese.

Figura 35. Título de anticorpo IgG2a anti-OVA produzido após tratamento com os lipossomas catiônicos e com iontoforese da OVA livre a 100 µg/mL, após duas imunizações. A linha preta nos gráficos indica o valor médio encontrado para o grupo controle negativo. Resultados expressos como média ± DP, n= 5. Análise estatística: *one-way* análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey (*Tukey's multiple comparison test*) ($P < 0,05$) utilizando o software *GraphPad Prism 5*, onde (*) refere-se a diferença estatística entre os grupos em relação ao controle positivo (SC OVA) ($P < 0,05$). DO: densidade óptica, SC: injeção subcutânea, Lip.: lipossoma, ionto: iontoforese.

Pode-se observar na Figura 34 que apenas o grupo de animal que foi tratado com a iontoforese do lipossoma catiônico contendo NPAg apresentou títulos de anticorpos IgG1 semelhantes ao do controle positivo e também valores superiores quando comparado ao controle negativo. Já a iontoforese catódica da dispersão de OVA livre a 100 µg/mL não foi capaz de gerar altos títulos de anticorpos. Também a mesma concentração de OVA em lipossomas associada com a iontoforese anódica, para comparação com a administração subcutânea da OVA composta por apenas 100 µg/mL também não levou à produção de títulos de anticorpos semelhantes aos obtido pelo grupo controle positivo.

Note que os títulos de anticorpos IgG1 produzidos após tratamento com os lipossomas catiônicos (que continham 0,25 mg/mL de OVA) e com a OVA a 100 µg/mL foram bem menores do que aqueles produzidos após os experimentos feitos com os lipossomas aniônicos e com a OVA livre a 5 mg/mL. Os primeiros foram diluídos 64 vezes para a análise enquanto que os que tinham 5 mg/mL de OVA foram diluídos 512 vezes (ver eixo y das Figuras 31 e 34).

Já para os títulos de anticorpos IgG2a anti-OVA dos grupos de animais que receberam a formulação catiônica e a dispersão de OVA em salina a 100 µg/mL, apenas o controle positivo apresentou títulos de anticorpos maiores do que o controle negativo (Figura 35).

5.5.2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A Figura 36 mostra a porcentagem de células T que expressam CD3 ativadas usando o marcador CD45 e CD44 após uma única imunização com a OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos, após tratamento passivo e por iontoforese catódica.

Figura 36. Porcentagem das células que expressam CD3 ativadas pelo marcador CD45 (A) e CD44 (B) após uma imunização com OVA livre e com lipossomas aniônicos. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 µL de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Na Figura 36A pode-se observar que todos os grupos que receberam a OVA por iontoforese catódica, além do grupo que recebeu a OVA encapsulada passivamente resultaram em expressão mais acentuada de linfócitos ativados T CD3CD45⁺ do que o grupo controle negativo. Já a expressão de células T CD3⁺ ativadas pelo marcador CD44⁺ foi mais expressiva para o grupo de animais tratados pela iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos que continham OVA e NPAg. Este aumento foi inclusive mais expressivo do que o apresentado pelo grupo controle positivo.

A Figura 37 mostra a porcentagem de células T que expressam CD3 ativadas usando o marcador CD45 após duas imunizações com a OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos, após tratamento passivo e por iontoforese catódica.

Figura 37. Porcentagem das células que expressam CD3 após administração passiva e por iontoforese catódica com a OVA livre e os lipossomas aniônicos: CD3 total (ativada ou não) (A), células que expressam CD3 e não estão ativadas (CD45⁻) (B), células que expressam CD3 e estão ativadas (CD45⁺) (C) e linfócitos T ativados, CD45⁺, na região *low* (D). Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Após duas imunizações como era esperado, o perfil de ativação celular obtido por citometria de fluxo foi distinto do observado com apenas uma imunização. Com relação aos linfócitos T totais: $CD3^+$, ativados ou não pelo marcador $CD45$ (Figura 37A), linfócitos T não ativados pelo marcador $CD45$ ($CD3^+CD45^-$) (Figura 37B), ativados pelo marcador $CD45$ ($CD3^+CD45^+$) (Figura 37C) e ativados especificamente na região de baixa fluorescência ($CD3^+CD45^{Low}$) (Figura 37D), de maneira geral não foi encontrada diferença entre os grupos de animais estudados.

Como a região de alta fluorescência (*high*) é a região de células mais importantes, nas quais estão presentes células de maior tamanho e complexidade, sendo indicativo de atividade durante o processo de imunização, os resultados subsequentes são apresentados levando em consideração esta região.

A Figura 38 mostra a porcentagem de linfócitos T $CD4^+$, na região de alta intensidade de fluorescência, $CD4^{high}$.

Figura 38. Porcentagem das células que expressam $CD4^+$ ativada, $CD45^+$, na região *high* após tratamento com a OVA livre e os lipossomas aniônicos passivamente e por iontoforese catódica. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

A pesquisa de linfócitos T $CD4^+$, na região de alta intensidade de fluorescência, $CD4^{high}$ (Figura 38) mostrou que todas as formulações que continham OVA e foram

administradas por iontoforese apresentaram maiores porcentagens de linfócitos T CD4 ativados do que os grupos controle positivo e negativo.

Com relação à porcentagem de células T CD8, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quando comparado as formulações administradas nos diferentes grupos de animais, incluindo os grupos controles, positivo e negativo.

Também foram analisadas as células que expressavam o marcador CD19, clássico para linfócitos B, células produtoras de anticorpos, após duas imunizações. A Figura 39 mostra a produção de células B ativadas na região *high*, após tratamento com OVA livre e com os lipossomas aniônicos na presença ou ausência da iontoforese catódica.

figura 39. Porcentagem das células B marcadas com CD19 ativadas na região *high* após tratamento com OVA livre e com os lipossomas aniônicos na presença ou ausência da iontoforese catódica. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Figura 39 mostra que a iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos contendo OVA, mas não a iontoforese da OVA livre, aumentou a expressão dos linfócitos B, CD19⁺, ativados na região de alta intensidade de fluorescência, CD45^{High}.

Resumidamente, os resultados de imunofenotipagem por citometria de fluxo mostraram que os animais tratados com a iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos contendo OVA apresentaram maior expressão linfócitos T CD4 ativados e de linfócitos B. Já a iontoforese catódica com a dispersão de OVA livre não foi capaz de ativar linfócitos T e B em porcentagens maiores que o controle negativo.

Os resultados referentes a expressão de linfócitos T e B apresentados a seguir referem-se aos tratamentos realizados com a iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos.

A Figura 40 mostra a porcentagem de células T que expressam CD3 ativadas na região *high* usando os marcadores CD44 e CD45 após duas imunizações com a OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos, após tratamento passivo e por iontoforese anódica.

Figura 40. Expressão de linfócitos T CD3 ativados na região de alta intensidade de fluorescência após a segunda imunização passiva e por iontoforese anódica com a OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos: ativação CD44 (A) e CD45 (B). Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Pode-se observar na Figura 40 que apenas os animais tratados com a iontoforese anódica com OVA livre e encapsulada no lipossoma aniônico sem NPAg ativaram linfócitos T CD3. Essa expressão só foi observada quando o marcador de ativação CD44 foi utilizado. Quando o marcador CD45 foi utilizado não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados.

Para os animais tratados com iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos, a pesquisa de linfócitos T CD4 através da técnica de citometria de fluxo utilizando as células do baço não indicou ativação dessas células quando foi usado o marcador de ativação CD44, uma vez

que não houve diferença estatística entre os grupos de animais estudados. Linfócitos T CD8 também não foram ativados pelo tratamento. A expressão de linfócitos B CD19⁺ após tratamento passivo e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo OVA está representada na Figura 41.

Figura 41. Porcentagem das células B marcadas com CD19 ativadas na região *high* após tratamento passivo e por iontoforese anódica com OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva.

Diferente do que havia sido observado para a iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos contendo OVA (Figura 39), não foi observada ativação de linfócitos B CD19 CD45⁺ nos tratamentos com a iontoforese anódica desses lipossomas (Figura 41). A marcação com CD44 também não possibilitou a quantificação da expressão maior dessas células.

Os resultados referentes a expressão de linfócitos T e B apresentados a seguir referem-se aos tratamentos realizados com a iontoforese anódica dos lipossomas catiônicos e a iontoforese catódica da OVA livre a 100 μ g/mL. Nessa etapa, optou-se em trabalhar com um número reduzido de animais e com isso, a retirada do baço foi realizada apenas depois da segunda imunização, no trigésimo sexto dia do estudo.

A Figura 42 mostra a porcentagem de células T que expressam CD3 ativadas na região *high* usando o marcador CD45 após duas imunizações com a OVA livre e encapsulada nos lipossomas catiônicos passivamente e por iontoforese anódica.

Figura 42. Expressão de linfócitos T CD3 com o marcador de ativação CD45 na região de alta intensidade de fluorescência após a segunda imunização por iontoforese catódica com a OVA livre a 100 µg/mL e passiva e por iontoforese anódica da OVA encapsulada nos lipossomas catiônicos. Quantidade de célula: 2×10^6 em 200 µL de PBS contendo 2% de BSA por animal. Os dados foram analisados utilizando o software FACSDiva.

Na região de alta intensidade de fluorescência não foi observada expressão maior de linfócitos T CD3CD45⁺ ativados em nenhum grupo tratado em relação ao controle negativo. As demais populações de células T, tanto CD3⁺ marcados com CD44, como linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e a população de linfócitos B, marcados com os marcadores CD45 e CD44 também não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais estudados.

5.5.3. Experimentos de reestimulação (OVA *recall*)

Os experimentos de reestimulação foram realizados com os grupos de animais que receberam a aplicação tópica de lipossomas aniônicos contendo OVA associada à iontoforese anódica (LIP-OVA), animais que receberam a aplicação tópica de lipossomas aniônicos sem OVA associada à iontoforese anódica (BR), animais que receberam injeção subcutânea de lipossoma aniônico contendo OVA (Sub) e animais naive, sem tratamento (Naive) (Figura 43).

Figura 43. Decaimento da fluorescência determinado por citometria de fluxo após iontoforese anódica e injeção subcutânea de lipossomas aniônicos, utilizando o software FCS Express V3, para os grupos de animais estudados e estimulados com OVA (10,0; 100,0 e 500,0 µg/mL) e ConA.

Com os dados obtidos da Figura 43, construiu-se um gráfico para verificar a diferença estatística entre os grupos de animais estudados nos diferentes meios em que as células foram estimuladas (Figura 44).

Figura 44. Proliferação de células CD4 nos diferentes grupos de animais tratados com iontoforese anódica e injeção subcutânea de lipossomas aniônicos e estimulados com OVA (10, 100 e 500 µg/mL) e ConA. * ($P < 0,05$) One-way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Pode-se observar na Figura 44 que apenas o grupo de animais que receberam o lipossoma contendo OVA por via subcutânea e foram estimulados com ConA apresentaram um decaimento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos valores de fluorescência, o qual está relacionado com a maior proliferação de células CD4. Já os demais grupos de animais não apresentaram diferença estatística nos meios estimulados ($p > 0,05$).

Para verificar se houve a resposta imune humoral nesses 4 grupos de animais, realizou-se novamente a dosagem de anticorpos IgG1, a qual está demonstrada na Figura 45.

Figura 45. Título de anticorpo IgG1 anti-OVA nos animais tratados por injeção subcutânea e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo ou não OVA após duas imunizações, realizados durante o experimento de OVA *recall*. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

A Figura 45 mostra que os grupos de animais que receberam o lipossoma aniônico contendo OVA associado à iontoforese anódica, bem como o lipossoma aniônico contendo OVA por via subcutânea apresentaram altos títulos de anticorpos IgG1, indicando, portanto, a ativação da resposta imune humoral. Os anticorpos utilizados nesse estudo foram anti-IgG1 de cabra.

5.5.4. Determinação de citocinas

Foi realizada a determinação das citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-17 no sobrenadante da cultura celular estimulados com ConA, OVA a 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, para os mesmos grupos de animais submetidos ao estudo de OVA *recall* (lipossomas aniônicos administrados por injeção subcutânea ou por iontoforese anódica). Os resultados da quantificação de IFN- γ estão demonstrados na Figura 46.

Figura 46. Determinação de IFN- γ nos animais tratados por injeção subcutânea e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo ou não OVA. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com ConA, (B) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 100 μ g/mL e (C) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 500 μ g/mL. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Na Figura 46A, o grupo de animais que recebeu a formulação lipossoma OVA associado à iontoforese anódica apresentou valores superiores (ANOVA, $p < 0,05$) de IFN- γ quando a cultura celular foi estimulada com ConA, comparado aos grupos de animais que receberam lipossoma OVA subcutâneo e o grupo controle negativo.

A determinação de IL-2 está demonstrada na Figura 47.

Figura 47. Determinação de IL-2 nos animais tratados por injeção subcutânea e por iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos contendo ou não OVA. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com ConA, (B) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 100 μ g/mL e (C) quantificação em cultura de células estimuladas com OVA a 500 μ g/mL. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Como observado com a produção de IFN- γ (Figura 46), o grupo de animais que recebeu a formulação lipossoma contendo OVA associado à iontoforese anódica também produziu maior quantidade ($p < 0,05$) de IL-2 comparado ao grupo controle positivo, quando o sobrenadante da cultura celular foi estimulado com ConA (Figura 47A).

Com relação à determinação de IL-17, nenhum grupo de animais que receberam as formulações em estudo foi capaz de produzir essa citocina. As citocinas IFN- γ e IL-2 também foram determinadas após tratamento dos animais por iontoforese catódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos. A produção de IFN- γ pode ser observada na Figura 48.

Figura 48. Determinação de IFN- γ nos animais tratados passivamente e por iontoforese catódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com OVA 100 μ g/mL e (B) quantificação em cultura de células estimuladas com anti-CD3. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Quando foi adicionado o estímulo de 100 μ g/mL de OVA à cultura de células houve uma produção elevada de IFN- γ nos grupos de animais que receberam lipossomas aniônicos por iontoforese catódica e passivamente, além do controle positivo (OVA subcutânea). Nos animais que receberam a iontoforese catódica dos lipossomas na presença da NPAg, no entanto, não foi possível determinar a INF- γ .

Com relação a determinação de IFN- γ na cultura celular estimulada com anti-CD3 (Figura 48B) apenas a formulação lipossoma aniônico contendo OVA administrada passivamente foi capaz de produzir altas quantidades dessa citocina.

A Figura 49 mostra a produção de IL-2 após tratamento dos animais por iontoforese catódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos.

Figura 49. Quantidade de IL-2 nos animais tratados passivamente e por iontoforese catódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos. (A) Quantificação em cultura de células estimuladas com OVA 100 µg/mL e (B) quantificação em cultura de células estimuladas com anti-CD3. Os asteriscos (*) referem-se à diferença estatística entre os grupos.

Quando a cultura celular foi estimulada com OVA (Figura 49A), apenas os animais do grupo controle positivo, ou seja, que receberam OVA subcutânea foi capaz de produzir maior quantidade de IL-2 (ANOVA, $p < 0,05$), quando comparado com os grupos tratados, bem como com o controle negativo. Porém a quantidade produzida dessa citocina foi baixa.

Com relação à quantificação de IL-2 na cultura de células estimuladas com anti-CD3 (Figura 49B), de maneira geral não houve diferença estatística entre os grupos de animais tratados (ANOVA, $p > 0,05$), exceto o grupo de animais que receberam a formulação lipossoma aniônico passivo apresentou valores mais baixos quando comparado ao grupo controle positivo ($p < 0,05$). Esse resultado não indicou proliferação celular, nem ativação da via Th1 pelos grupos tratados.

5.5.5. Estudo de recrutamento de células apresentadoras de antígenos

No estudo de recrutamento das células apresentadoras de antígenos foram analisadas as células dendríticas presentes no baço e nos linfonodos inguinais, separadamente, nos

grupos de animais que receberam tratamento com o lipossoma aniônico associado a iontoforese catódica contendo OVA marcada com FITC.

Figura 50. Análise por citometria de fluxo da janela (gate) de células apresentadoras de antígenos estimuladas após tratamento com iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos marcados com OVA FITC. (A) APCs quantificadas no baço, (B) APCs quantificadas no linfonodo. O quadrante preto delimita a população de células dendríticas analisada.

Pode-se observar na Figura 50 que a porcentagem de células dendríticas presentes no baço e no linfonodo foi de 19,85% e de 11,88%, respectivamente. Essas populações de células dendríticas são células ativadas e, portanto podem ser mais atuantes na resposta imune. Portanto, na janela delimitada na Figura 50A, estudou-se a fluorescência das células do baço decorrente da aplicação das formulações, sendo os resultados expressos na Figura 51.

Figura 51. Porcentagem de células dendríticas fluorescentes no baço dos animais tratados com iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos marcados com OVA FITC.

Os valores de fluorescência das células do baço dos animais tratados com lipossoma aniônico contendo OVA FITC associado à iontoforese catódica foram superiores aos obtidos nas células do baço dos animais tratados com lipossoma sem OVA e associados à iontoforese catódica (t-test, $p < 0,05$) (Figura 51).

Na janela delimitada na Figura 50B, estudou-se a fluorescência das células dendríticas localizadas nos linfonodos inguinais, sendo os resultados de cada animal estudado expressos na Figura 52.

Figura 52. Porcentagem de células dendríticas fluorescentes dos linfonodos inguinais dos animais tratados com iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos marcados com OVA FITC.

A porcentagem de células dendríticas fluorescentes nos linfonodos inguinais dos animais tratados com lipossoma aniônico contendo OVA FITC associado à iontoforese catódica também foram superiores aos obtidos nas células dos linfonodos dos animais tratados com lipossoma sem OVA e associados à iontoforese catódica (t-test, $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A OVA é uma fosfoglicoproteína monomérica bastante utilizada como modelo de antígeno para estudar a resposta imune em modelos animais, bem como para encapsulação em sistemas de liberação como os lipossomas e nanopartículas (PULENDRAN *et al.*, 2013, LI-B *et al.*, 2011; SAHDEV *et al.*, 2013). Para entender a influência do sistema de liberação na imunização transcutânea utilizando a OVA como modelo de antígeno, foi necessário padronizar um método para quantificar a OVA na formulação lipossomal.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004). Segundo a ANVISA; “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).

O método proposto apresentou-se linear em toda a faixa de concentração estudada (100 a 1500 µg/mL) (Figura 11). A precisão (CV%) e a exatidão (E%) do método analítico foram avaliadas por análises intra e inter-dia. Esses estudos permitem concluir sobre o erro analítico do método (CAUSON, 1997). A precisão, dada pelos coeficientes de variação intra e inter ensaio, pode ser definida como o grau de concordância entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas, seja a repetibilidade (variação intra ensaio) ou a reprodutibilidade (variação inter ensaio). A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (TAVERNIERS *et al.*, 2004; RIBANI, 2004). Segundo a resolução 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, não são aceitos valores acima de 5% para a precisão. Desta forma, como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4, o método em estudo para a análise da OVA apresentou valores de precisão condizentes com o limite aceitável pela agência reguladora vigente no país, e valores de erro (exatidão) também abaixo de 5%. Além disso, as soluções de OVA em tampão fosfato pH 7,4 0,01 M em concentrações menores do que aquelas preparadas para a construção da curva de calibração, na análise de linearidade, apresentou valores de exatidão (E%) e precisão (CV%) aceitáveis (Tabela 5); abaixo de 5%, para todas as concentrações analisadas nesse estudo, incluindo as concentrações de 50 e 75 µg/mL, inferiores a mínima de 100 µg/mL utilizada na construção da curva de calibração elaborada para o estudo de linearidade. Desta forma, a sensibilidade do método analítico desenvolvido para avaliação da OVA apresentou-se adequada para a quantificação da OVA

nas concentrações em que ela está presente nas formulações desenvolvidas neste trabalho. Apesar de sensível, o método não foi seletivo. A seletividade é a capacidade do método em determinar precisamente e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes da amostra nas condições estabelecidas do teste, sendo um parâmetro de confiabilidade do método (TAVERNIERS *et al.*, 2004). Alguns lipídeos absorveram no mesmo comprimento de onda da amostra quando a mesma foi analisada diretamente no espectrofotômetro. Quando as dispersões lipossomais foram filtradas usando o dispositivo AMICON, no entanto, os lipídios não interferiam na quantificação da OVA. Por isso, a eficiência de encapsulação da OVA nas dispersões lipossomais foi determinada pela diferença entre a quantidade teórica de OVA adicionada para a obtenção dos lipossomas e a quantidade determinada no ultrafiltrado, como descrito no item 4.6.4.

A escolha dos fosfolipídios na obtenção de lipossomas contendo OVA é de grande importância para as características físico-químicas e estabilidade do sistema nanoparticulado (BRGLES *et al.*, 2008). O lipossoma aniônico com características de tamanho, PdI e potencial zeta considerado aceitável para o trabalho proposto foi o composto pelos lipídios PC e DOPE (Tabela 7), ambos provenientes da soja e classificados como lipídio de carga neutra e carga negativa, respectivamente. Os lipossomas por eles formados foram os que apresentaram menor tamanho e polidispersividade quando comparado com as outras misturas de lipídios. A concentração da dispersão de OVA utilizada para hidratar o filme lipídico não influenciou de forma significativa ($P < 0,05$) no tamanho e PdI dos lipossomas compostos por PC e DOPE (3:1). Corroborando com os nossos resultados, BRGLES *et al.*, (2008) também não obtiveram variação estatisticamente significativa quando aumentaram a concentração de OVA de 0,25 mg/mL para 7,5 mg/mL em lipossomas formados pela mistura de lipídios PC/DOPE/DOTAP. Porém, os pesquisadores obtiveram lipossomas com tamanho médio de aproximadamente 800 nm, quando preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, sem submeter a formulação à forte agitação, após o preparo. No entanto, o aumento da concentração de OVA diminuiu o potencial zeta de -22 mV para -7,5 mV (Tabela 7). Este resultado sugere que a OVA interage com os fosfolipídios da bicamada lipídica dos lipossomas aniônicos, alterando o potencial zeta do sistema. É sabido que o DOPE facilita a formação de vesículas lipossomais e também promove a estabilização estérica da bicamada lipídica desse sistema carreador (BERGSTRAND *et al.*, 2003).

O princípio básico de formação de lipossomas, com relação ao método de preparo, se deve à interação hidrofóbica entre moléculas do próprio lipídio e hidrofílica entre as

moléculas do lipídio com o solvente hidrofílico. O fornecimento de energia na forma de agitação, homogeneização, sonicação ou aquecimento faz com que as moléculas lipídicas organizem-se na forma de bicamadas, com o objetivo de atingir o equilíbrio termodinâmico na fase aquosa (MOZAFARI, 2005). No estudo em questão esse equilíbrio foi atingido através do fornecimento de energia promovido pela agitação no ultra-turrax e homogeneização no equipamento homogeneizador de alta pressão. Durante o preparo dos lipossomas é necessário trabalhar em temperaturas acima da transição de fases (T_c) dos lipídios para se certificar de que todos os fosfolípidos estejam dissolvidos no meio e também para garantir uma flexibilidade suficiente para alinhar os lípidos na estrutura de vesículas formadas por bicamadas (MAHERANI *et al.*, 2012). Como os lipídios PC e DOPE apresentam a T_c de -20 e -16 °C, respectivamente (LIPOID GmbH, 2011) o preparo das dispersões foi realizado a temperatura de 25 °C, garantindo dessa forma a fluidez dos lipídios e favorecendo o seu arranjo em bicamadas, formando as vesículas lipossomais.

No preparo dos lipossomas catiônicos foram selecionados os lipídios PC, DOTAP, DOPE, DMPC e colesterol. O fosfolípido DOTAP foi escolhido por proporcionar carga positiva aos lipossomas e também por ser muito utilizado associado a fármacos protéicos (YAN; HUANG, 2009, MANSOURIAN *et al.*, 2014). Já o PC, o DOPE, o DMPC e o colesterol foram escolhidos por aumentar a rigidez da bicamada lipídica, proporcionando estabilidade aos lipossomas. A concentração de 5 mg/mL de OVA adicionada aos lipossomas foi selecionada com base em alguns lipossomas contendo OVA já descritos na literatura (LI *et al.*, 2011-B, GUO *et al.*, 2013) com o intuito de propiciar um gradiente de concentração positivo da OVA através do EC e facilitar sua quantificação nos estudos *in vitro*. A concentração da dispersão de OVA utilizada para hidratar o filme lipídico não influenciou de forma significativa ($P > 0,05$) no tamanho e PDI dos lipossomas compostos por PC e DOPE (3:1). Desta forma, para garantir sua quantificação na pele, os experimentos com os lipossomas aniônicos foram realizados com a mistura PC/DOPE contendo 5 mg/mL de OVA. No entanto, não foi possível obter lipossomas catiônicos adequados com esta concentração de OVA (Tabela 8). Nesses lipossomas, a adição de 5 mg/mL de OVA resultou em dispersões com potencial zeta negativo. Isso ocorre provavelmente porque o ponto isoelétrico da OVA é de 4,5. Desta forma ela encontra-se ionizada negativamente no pH 7,4. Com o aumento da concentração de OVA de 0,25 para 5 mg/mL tem-se a tendência de aumentar o residual de cargas negativas do sistema. Nos estudos com os lipossomas aniônicos não foi observado aumento no potencial zeta do sistema quando altas concentrações de OVA foram

incorporadas (Tabela 7) sugerindo que ela não está disponível no meio de dispersão, podendo estar interagindo com os fosfolípidios da bicamada lipídica dos lipossomas aniônicos. Mas a adição desse excesso de OVA aos lipossomas catiônicos não facilitou sua incorporação devido, provavelmente, as características dos lípidios usados para a obtenção desses lipossomas e rigidez da membrana. Sendo assim, os lipossomas catiônicos utilizados nos estudos *in vitro* e *in vivo* continham apenas 0,25 mg/mL de OVA. Mesmo alterando a concentração de OVA foi possível comparar os resultados de permeação *in vitro* dos lipossomas catiônicos e aniônicos calculando-se o coeficiente de permeabilidade, como discutido mais adiante.

As NPAg preparadas para posterior incorporação aos lipossomas apresentaram tamanho médio de aproximadamente 20 nm no equipamento DLS e o potencial zeta de - 8,44 ($\pm 0,43$) mV. Essa carga relativamente negativa era esperada e relatada na literatura, uma vez que a presença dos íons nitrato e borato, usados para sua obtenção, podem ficar adsorvidos na superfície das NPAg (KIM *et al*, 2007).

Quando incorporadas aos lipossomas, as NPAg não alteraram o potencial zeta das dispersões catiônicas, mas aumentaram significativamente o potencial zeta das aniônicas (Tabela 10). As alterações no potencial zeta causadas pelas NPAg nos lipossomas aniônicos e a ausência de alterações causadas nos lipossomas catiônicos pode estar relacionada a distribuição das NPAg nos lipossomas. Alguns estudos mostram que nanopartículas metálicas são capazes de serem encapsuladas, seja no compartimento aquoso interno ou dentro da bicamada lipídica das vesículas lipossomais (PARK *et al.*, 2006; BOTHUN; 2008). As cadeias alquílicas da bicamada lipídica são mais flexíveis do que as cabeças polares e, portanto, capazes de armazenar nanopartículas metálicas sem que ocorra a ruptura da membrana (PAASONEN *et al*, 2010). Desta forma, dependendo da composição dos lipossomas, as NPAg podem estar incorporadas às vesículas ou apenas distribuídas na dispersão aquosa. Para inferir sobre a distribuição das NPAg nos lipossomas desenvolvidos, análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas. Pode-se observar nas Figuras 25 e 26, respectivamente, que as NPAg parecem dispersas no meio aquoso externo nas dispersões aniônicas e incorporadas aos lipossomas na dispersões catiônicas. Desta forma, a presença de NPAg aniônicas no meio dispersante alterou o potencial zeta dos lipossomas aniônicos. Já sua provável incorporação no meio aquoso interno das vesículas catiônicas não alterou significativamente o potencial zeta positivo dos lipossomas catiônicos.

A microscopia eletrônica de transmissão também permitiu a observação da morfologia e distribuição de tamanho das vesículas lipossomais. Nesses estudos as amostras de lipossomas foram coradas com acetato de uranila que é um sal de metal e agente de contraste. O acetato de uranila se liga ao grupo fosfato dos fosfolipídios, permitindo a visualização do contorno dos lipossomas (Figuras 21 e 23) sem discriminar detalhes finos (HARRIS, 1986). Na presença desse agente de contraste não foi possível observar as NPAg (Figuras 22 e 24). No entanto, como a Ag é um material mais denso que os lipossomas, quando o agente de contraste foi eliminado do preparo das amostras que continham as NPAg elas puderam ser observadas, mas, naturalmente, sem boa resolução das vesículas lipossomais (Figura 25 e 26).

A análise das imagens obtidas por AFM também permitiu inferir sobre a distribuição de tamanho e presença/ausência de agregados de lipossomas adsorvidos em uma superfície sólida (KARN *et al.*, 2013, VARYPATAKI *et al.*, 2015). Em todas as formulações analisadas com a AFM, foram visualizadas regiões com coloração branca mais intensa à qual se referem às partículas de tamanho maior, que podem ser agregados de lipossomas, uma vez que eles podem fundir quando em contato com o substrato na temperatura de análise da AFM (RUOZI *et al.*, 2007, BHUVANA *et al.*, 2012). Apesar desta polidispersão, o tamanho médio das vesículas obtido por AFM para a dispersão de lipossomas aniônicas sem NPAg foi um pouco menor do que o observado nas amostras analisadas por DLS. Este maior tamanho observado no DLS pode estar relacionado a hidratação da amostra, uma vez que esta técnica permite a avaliação do diâmetro hidrodinâmico das vesículas. Nas análises por microscopia as amostras estavam secas e, portanto, não hidratadas. Para os lipossomas aniônicos adicionados de NPAg o valor foi maior por AFM comparado ao DLS, o que pode ser devido à presença de agregados na mica.

Em suma, os estudos de microscopia possibilitaram avaliar a morfologia, o tamanho e a distribuição de tamanho das vesículas lipossomais. O estudo de MET permitiu ainda observar a possível localização das NPAg nas dispersões lipossomais.

Com relação à EE% da OVA nos lipossomas, ela pode ser influenciada por vários fatores, dentre eles estão a técnica de preparo, tempo de hidratação, lamelaridade da vesícula (unilamelar ou multilamelar), natureza do composto encapsulado, composição do tampão, tamanho da vesícula, entre outros (BRGLES *et al.*, 2008). A EE% da OVA foi maior nos lipossomas catiônicos do que nos lipossomas aniônicos. Este resultado pode ter ocorrido pela própria quantidade de OVA disponível para incorporação; 20 vezes menor no lipossoma catiônico. Desta forma, apesar da menor EE% da OVA nos lipossomas aniônicos, a

quantidade de OVA encapsulada foi muito maior do que nos lipossomas catiônicos. A adição de NPAG aos lipossomas aniônicos não alterou significativamente a EE% da OVA (Tabela 11). Surpreendentemente, no entanto, a adição de NPAG aos lipossomas catiônicos aumentou levemente a quantidade de OVA encapsulada. Este resultado não era esperado porque, como observado nos estudos de MET com esses lipossomas (Figura 26), as NPAG parecem estar encapsuladas nas vesículas e poderiam competir com a OVA por esta região. Desta forma, esses resultados sugerem que a OVA interage com a bicamada lipídica dos lipossomas catiônicos: como a OVA apresenta carga negativa no pH fisiológico e esses lipossomas possuem em sua composição um lipídio catiônico (DOTAP), é razoável supor que a OVA interage com a bicamada lipídica. A adição das NPAG à dispersão lipossomal aumenta um pouco esta interação possivelmente devido a redistribuição de cargas no sistema. Os valores de EE% obtidos no presente trabalho foram altos e corroboram com outros estudos da literatura (LI *et al.*, 2011-B, GUO *et al.*, 2013). Por exemplo, lipossomas compostos por fosfatidilcolina e colesterol (4:1), preparados na mesma concentração inicial de OVA apresentaram EE% de $77.9 \pm 19.2\%$ (LI *et al.*, 2011-B).

Independente da composição dos lipossomas e presença de NPAG, a OVA apresenta-se íntegra nas dispersões, como observado nos estudos de eletroforese (Figuras 15 e 16).

Quanto a estabilidade física dos lipossomas em função do tempo, a adição das NPAG não aumentou, de maneira geral, a estabilidade dos lipossomas. Um pequeno aumento de tamanho foi observado em função do tempo quando as NPAG foram adicionadas aos lipossomas. Os valores de potencial zeta também alteraram com o tempo; as dispersões catiônicas ficaram menos catiônicas e as aniônicas mais negativas. Este aumento de tamanho e alteração do potencial zeta pode estar relacionado com a cinética de liberação da OVA. Estima-se que a presença da NPAG aumente a velocidade de liberação da OVA, negativamente carregada em pH fisiológico, que pode agregar, aumentando o tamanho das partículas dispersas no meio. Não foi feito, no entanto, um estudo de liberação que confirme esta hipótese porque estudos preliminares mostraram que a OVA agregada não atravessa a membrana hidrofílica de acetato de celulose. Este comportamento inviabiliza inferir sobre a velocidade de liberação da OVA do lipossoma, uma vez que após liberada do lipossoma ela agrega e não atravessa a membrana. Desta forma, com os equipamentos e condições experimentais utilizadas neste trabalho não foi possível determinar a velocidade de liberação da OVA dos lipossomas.

Ainda com relação aos estudos de estabilidade física dos lipossomas, os valores de pH não apresentaram alteração (Tabelas 12 e 13) durante o tempo de estudo, sugerindo que não ocorreu oxidação dos fosfolipídeos e nem degradação da OVA.

A aplicação dos lipossomas na terapêutica muitas vezes é comprometida pela sua instabilidade físico-química em dispersões aquosas, como por exemplo, hidrólise e oxidação dos fosfolipídios, vazamento da substância encapsulada e agregação das vesículas lipossomais durante o tempo de armazenamento. Uma forma de contornar essa instabilidade é empregar o processo de liofilização, o qual remove a água do sistema gerando um produto sólido. Dessa forma, o armazenamento dos lipossomas na forma liofilizada representa uma alternativa viável, sendo esse processo bastante empregado para secagem de proteínas e peptídeos, os quais também são fisicamente e/ou quimicamente instáveis em solução aquosa (CHEN *et al.*, 2010; MOHAMMED *et al.*, 2006).

No presente trabalho, para evitar qualquer alteração na estabilidade física dos lipossomas caracterizados, os estudos de penetração *in vitro* e *in vivo* foram realizados com dispersões preparadas 24 h antes dos experimentos.

A aplicação de 15 min de corrente elétrica a 0,5 mA, a mesma aplicada nos estudos *in vitro* e *in vivo*, não alterou significativamente o tamanho, o PdI e o pH das dispersões (Tabelas 14 e 15), mas alterou o potencial zeta. Como os lipossomas são sistemas dinâmicos, a passagem da corrente elétrica pode ter alterado a interação da OVA e das NPAG com os lipossomas, ocasionando o aumento dos valores de potencial zeta. A variação do potencial zeta causada durante a aplicação da corrente elétrica não foi suficiente para alterar o tamanho das vesículas, mas pode sugerir modificação na liberação da OVA e das NPAG dos lipossomas. Variações na liberação da OVA frente a corrente elétrica e sua influência na penetração da OVA foram inferidas a partir dos estudos de penetração cutânea *in vitro* na presença e ausência da iontoforese, os quais serão discutidos a seguir.

Desta forma, para verificar se a iontoforese foi capaz de liberar OVA dentro da pele em um período curto de administração, de 15 minutos, estudos *in vitro* foram realizados. Foram avaliadas a permeação passiva e iontoforética de todas as formulações preparadas: OVA livre a 5 mg/mL, lipossomas aniônicos de OVA a 5 mg/mL contendo ou não NPAG e lipossomas catiônicos contendo 0,25 mg/mL de OVA contendo ou não NPAG. As dispersões de OVA e de lipossomas aniônicos foram avaliadas após iontoforese anódica e catódica. As dispersões de lipossomas catiônicos foram avaliadas somente após iontoforese anódica. Isto porque a OVA e os lipossomas aniônicos podem sofrer contribuição do fluxo eletrosmótico

quando a formulação é colocada em contato com o ânodo e a contribuição do fluxo eletromigratório quando a formulação é colocada no cátodo, ou seja, não ocorre a contribuição dos dois fluxos a partir do mesmo compartimento. Porém, a formulação de lipossomas catiônicos quando colocados no eletrodo positivo, ou seja, no ânodo, sofrem a contribuição dos fluxos eletrosmótico e eletromigratório em conjunto a partir desse compartimento.

A iontoforese de todas as formulações estudadas aumentou significativamente a penetração cutânea da OVA quando comparada à formulação respectiva não submetida à iontoforese (passiva) (Figuras 28 a 30). No EC, este aumento variou de aproximadamente 3 vezes, para as formulações de lipossomas catiônicos contendo ou não NPAg, a 630 vezes, para os lipossomas aniônicos sem NPAg. Na epiderme viável, o maior aumento encontrado foi resultante da iontoforese dos lipossomas aniônicos contendo NPAg; 108 vezes, seguido do aumento provocado pela iontoforese dos lipossomas catiônicos com NPAg; 92 vezes. Desta forma, de maneira geral, a adição de NPAg aos lipossomas aumentou a razão de penetração da OVA na epiderme viável quando a iontoforese foi aplicada. Para os lipossomas catiônicos, no entanto, a quantidade de OVA penetrada na epiderme viável após a iontoforese na presença das NPAg foi menor do que aquela penetrada após a iontoforese na ausência das NPAg (Figura 30). Uma explicação para este resultado é a diminuição da penetração passiva da OVA na epiderme viável causada pela presença das NPAg (14 vezes para os lipossomas aniônicos – Figura 29 e 3,75 vezes para os lipossomas catiônicos – Figura 30). Passivamente, as NPAg diminuem a penetração da OVA possivelmente devido a competição por caminhos difusionais semelhantes através do EC. Na iontoforese, estima-se que a presença das NPAg facilitaram a penetração da OVA devido ao aumento da condutividade elétrica conferido pela Ag.

Pode-se observar ainda nos estudos de iontoforese *in vitro*, que, quando presente na mesma concentração na formulação, a OVA livre (Figura 28) penetra menos a pele do que a OVA encapsulada nos lipossomas. Isto significa que a iontoforese dos lipossomas possibilitou o direcionamento da OVA para a epiderme viável, onde estão presentes as células apresentadoras de antígenos (APCs), do que a dispersão simples de OVA.

Devido a diferença de concentração inicial entre os lipossomas aniônicos (5 mg/mL) e catiônicos (0,25 mg/mL) e com o intuito de estudar a influência do potencial zeta dos lipossomas na penetração da OVA por iontoforese, calculou-se o coeficiente de penetração da OVA em cada formulação lipossomal dividindo-se a quantidade penetrada pela concentração

inicial administrada (Tabela 16). A iontoforese dos lipossomas aniônicos aumentou 1,6 vezes o coeficiente de permeação da OVA em relação a iontoforese dos lipossomas catiônicos. Este aumento pode estar relacionado com o tamanho dos lipossomas; os aniônicos são aproximadamente 2,1 vezes menores do que os catiônicos (Tabela 10). A adição das NPAg aos nesses lipossomas aniônicos aumentou o coeficiente de penetração da OVA, provavelmente devido ao aumento da condutividade da formulação fornecida pelos íons da Ag. A iontoforese anódica dos lipossomas catiônicos, no entanto, ao contrário do suposto, diminuiu o coeficiente de penetração da OVA. É provável que a Ag, que forma as NPAg, compita com os lipossomas catiônicos pela corrente elétrica, dificultando a penetração da OVA encapsulada nesses lipossomas. As NPAg também diminuíram a penetração passiva da OVA encapsulada. Esta menor penetração passiva somada a competição pela corrente elétrica na iontoforese resultou na menor penetração da OVA neste caso. A Ag que penetrou na pele não foi quantificada, mas é possível que sua penetração melhore a resposta imune devido a sua função como adjuvante imunológico. Essa influência será discutida a seguir, nos estudos *in vivo*.

Para estudar a efetividade das vacinas faz-se necessário a determinação dos títulos de anticorpos. No presente trabalho foi realizada a dosagem das imunoglobulinas (Ig) M, IgG1 e IgG2a. Após uma única imunização, os grupos de animais estudados não apresentaram, de maneira geral, diferença estatística significativa nos títulos desses anticorpos com relação aos grupos controle positivo e negativo (Figuras 31A, 32A e 33A). Baixos títulos desses anticorpos são comuns após a primeira imunização porque as células B específicas a um determinado antígeno precisam receber inicialmente ajuda das células T para proliferarem em estruturas especializadas, chamadas centros germinativos, e se diferenciarem em células secretoras ou em células de memória. Sendo assim, os títulos de IgG alcançam o seu valor mais alto geralmente após 4 semanas da imunização. Os títulos desses anticorpos declinam em um curto período devido à vida curta das células plasmáticas que os secretam. Após a segunda imunização, o antígeno reativa a memória imunológica e resulta em um rápido aumento nos títulos de IgG (MACLENNAN *et al.*, 2003). Dessa forma, a vacinação efetiva deve aumentar os níveis de anticorpos a um antígeno específico no soro (MOSER; LEO, 2010, COMBADIÈRE; LIARD, 2011). De fato, todas as formulações de lipossomas aniônicos com 5 mg/mL de OVA submetidos a iontoforese, anódica e catódica, induziram títulos de IgG1 semelhantes ao controle positivo (injeção subcutânea de OVA) após a segunda imunização (Figura 31 B). A iontoforese catódica da OVA livre a 5 mg/mL também produziu

títulos de IgG1 semelhantes ao controle. No entanto, a iontoforese anódica da OVA livre não aumentou os títulos de IgG1 em relação ao controle negativo.

Desta forma, a quantidade de OVA capaz de entrar na pele após a iontoforese da dispersão de OVA livre a 5 mg/mL (Figura 28) parece não estar diretamente relacionada com a resposta imune obtida nos estudos *in vivo* (Figura 31). Mais especificamente, apesar de *in vitro* a iontoforese catódica e anódica da dispersão de OVA em tampão fosfato resultarem em quantidades semelhantes de OVA na epiderme viável e na solução receptora (Figura 28), nos estudos *in vivo*, apenas a iontoforese catódica dessa dispersão de OVA em tampão fosfato resultou em títulos de anticorpos IgG1 anti-OVA semelhantes ao controle positivo (Figura 31B). É provável que a iontoforese catódica em si, associada à presença de antígeno, esteja estimulando a resposta imune. Sabe-se que, *in vivo*, a iontoforese induz eritema intenso no cátodo e apenas modesto no ânodo (BERLINER, 1997). Esta maior ativação da microcirculação local provocada pelo cátodo pode ser uma das responsáveis pela maior resposta imune obtida com a aplicação da iontoforese catódica da OVA em relação à anódica. A iontoforese catódica da OVA também foi capaz de ativar linfócitos T CD4 (Figura 38); populações de células importantes na resposta imune e que será discutido mais a frente. Dessa forma, a OVA livre sofreu influência dos fluxos eletrosmótico a partir da iontoforese anódica e eletromigratório a partir da iontoforese catódica para permear altas quantidades de OVA na epiderme viável e no EC, porém altos títulos de anticorpos foram obtidos apenas após a iontoforese catódica.

Já a iontoforese catódica da OVA a 100 µg/mL, concentração esta semelhante a administrada por via subcutânea (controle positivo), não favoreceu à produção de títulos de anticorpos semelhantes aos obtidos pelo grupo controle positivo (Figura 34). Isso pode ter ocorrido pelo fato de que na imunização transcutânea tem-se a necessidade de administração de altas doses de antígenos, já que não é toda a quantidade de antígeno veiculada que penetrará a pele e ficará disponível para as APCs (AZIZI *et al.*, 2010).

A encapsulação de apenas 250 µg/mL de OVA nos lipossomas catiônicos foi capaz, no entanto, de desencadear produção de títulos de IgG1 estatisticamente semelhantes ao controle positivo (Figura 34). A encapsulação da OVA nos lipossomos, portanto, que aumenta de maneira geral a quantidade de OVA disponível na epiderme viável após iontoforese, como mostrado nos estudos *in vitro*, também parece favorecer a produção de anticorpos específicos mesmo quando administradas em baixas concentrações.

Os experimentos de iontoforese anódica e catódica com os lipossomas aniônicos a 5 mg/mL foram realizados na tentativa de compreender a influência dos fluxos eletromigratório (iontoforese catódica) e eletrosmótico (iontoforese anódica) na penetração da OVA encapsulada. A eletrosmose parece ter favorecido mais a penetração da OVA uma vez que quantidades um pouco maiores de OVA foram encontradas, principalmente no EC, quando a iontoforese anódica foi aplicada, tanto para os lipossomas sem como para os com NPAg (Figura 29). Nos estudos *in vivo*, no entanto, não se observou diferença significativa entre os títulos de IgG1 produzidos após iontoforese anódica e catódica dos lipossomas aniônicos (Figura 31B). É possível que a concentração de OVA que alcança a epiderme nesses casos já esteja alta o suficiente para desencadear a resposta imune. Desta forma, não foi possível inferir sobre a influência do fluxo eletrosmótico e eletromigratório na resposta imune nas condições em que os experimentos foram realizados, pois ambos resultaram em respostas adequadas e semelhantes. Apesar disso, esses resultados sugerem que concentrações menores do que 5 mg/mL podem ser usadas para se ter uma resposta imune com a iontoforese.

Quando a iontoforese anódica dos lipossomas catiônicos contendo 0,25 mg/mL de OVA foi realizada, por exemplo, obteve-se títulos de IgG1 semelhantes ao controle positivo quando a iontoforese dos lipossomas foram realizadas na presença das NPAg, mas não na sua ausência (Figura 34). Estes resultados confirmam a possibilidade em se conseguir uma resposta imune com baixas concentrações de OVA por iontoforese e sugerem que as NPAg estejam funcionando como adjuvantes imunológicos. Isto porque foi observado nos estudos *in vitro* que menores quantidades de OVA chegavam à epiderme viável quando os lipossomas catiônicos eram administrados na presença de NPAg (Figura 30), mas os títulos de IgG1 induzidos após a iontoforese desta formulação foi maior do que quando as NPAg não estavam presentes (Figura 34). Estima-se, portanto, que a Ag penetre a pele e contribua com a indução da resposta imune.

Outra discussão importante referente a imunização transcutânea está relacionada a produção de IgG2a. Como pode ser observado nas Figuras 32B e 35, apenas a administração subcutânea da OVA resultou em produção relevante de IgG2. Fica evidente que a administração transcutânea das formulações contendo OVA leva à maior produção da classe de anticorpo IgG1 quando comparada aos títulos de anticorpos IgG2a. A produção de anticorpos IgG1 está relacionada com a resposta imune via Th2 e a produção de anticorpos IgG2a está relacionada com a resposta imune via Th1. Como demonstrado nos trabalhos de Guo e colaboradores (2013) e Quan e colaboradores (2010), a imunização transcutânea gera

uma maior resposta via Th2. A resposta imune via Th2 é essencial para a proteção contra patógenos extracelulares, como por exemplo, bactérias. Já a via Th1 é especializada contra patógenos intracelulares, como algumas espécies de *mycobacterium* e vírus influenza. Dessa maneira, dependendo do alvo da vacina, torna-se necessário um balanço Th1/Th2, que pode ser feito com a adição de adjuvantes para se obter uma formulação que induza uma maior resposta via Th1 (KOUTSONANOS *et al.*, 2009)

Com relação aos títulos de anticorpos IgM anti-OVA, de uma maneira geral, os níveis mantiveram-se baixo após a primeira e segunda imunização, para todas as formulações estudadas, independente da via de administração (Figura 33). Tentou-se quantificar IgM porque ele é a primeira classe de anticorpo gerada após a imunização, sendo que depois ocorre a troca para IgG, mas não foi possível quantificá-lo nas condições em que o experimento foi realizada.

Na imunização transcutânea a apresentação do antígeno ocorre nos órgãos linfóides secundários, os quais são: linfonodos próximos à pele e o baço. Nessas duas regiões ocorre a produção de anticorpos e proliferação de linfócitos ativados desencadeando a resposta imune. A pesquisa de linfócitos na imunofenotipagem foi realizada nas células do baço através da citometria de fluxo, a qual gera informações importantes sobre a polifuncionalidade, capacidade proliferativa, fenótipo e ativação dos linfócitos T, além de caracterizar linfócitos B para determinado antígeno. A escolha do baço foi feita porque ele é um órgão de fácil acesso e possui maior quantidade de células comparada aos linfonodos drenantes da pele (DE ROSA, 2012).

Os marcadores de ativação CD44 e CD45 utilizados na citometria de fluxo são indicadores de resposta imune e estão expressos nas células T maduras e células B, dentre outras células, após o contato com antígenos. Os linfócitos T são representados pelo marcador CD3, sendo que essas células podem expressar CD4 ou CD8. Os linfócitos T que expressam CD4 são chamados de células ou linfócitos T CD4 e na administração de antígenos protéicos como a OVA, são requeridos pelos anticorpos durante o processo de imunização, sendo indicativo de efetividade da resposta imune.

Os resultados obtidos com relação aos linfócitos T ativados ($CD3^+ CD44^+$ e $CD3^+ CD45^+$), após uma imunização, indicam que a iontoforese catódica das formulações, principalmente dos lipossomas aniônicos contendo OVA e NPAg, foram capazes de ativar essa população de células T. Como os linfócitos T são recrutados na resposta imune à vacinas, a sua ativação pode ser um indicativo de efetividade da mesma. O reconhecimento do

antígeno por parte das células T é uma regra essencial na imunidade humoral, já que elas são capazes de reconhecer especificamente um MHC estranho, distribuídos aleatoriamente sobre a superfície das APCs, além de ter diversas funções e graus de capacidade de respostas altamente específicas para o reconhecimento de antígenos. Mais ainda, o modelo de antígeno utilizado, a OVA é uma proteína e sendo assim é timo-dependente, ou seja, é dependente de células T para a produção de anticorpos (HUANGA, MEYER, ZHUC, 2012).

Após duas imunizações, como era esperado, o perfil de ativação celular obtido por citometria de fluxo foi distinto do observado com apenas uma imunização, não sendo possível observar tão claramente a ativação dos linfócitos TCD3 após os tratamentos (Figura 37). Mas a pesquisa específica por linfócitos T CD4⁺, na região de alta intensidade de fluorescência, CD4 CD45^{high} (Figura 38), indicou claramente que as formulações aniônicas (OVA livre e lipossomas aniônicos) que continham OVA submetidas a iontoforese catódica ativaram essas células. Dentre essas três formulações todas geraram também altos títulos de anticorpos IgG1 (Figura 31B), semelhantes ao grupo controle positivo. Ressalta-se, no entanto, que a expressão de linfócito T CD4 gerada pelo tratamento com iontoforese catódica foi maior do que a gerada pela injeção subcutânea de OVA (Figura 38). Esse resultado sugere que a iontoforese catódica dessas formulações gera uma resposta humoral timo dependente mais agressiva do que a injeção subcutânea da OVA.

O estudo realizado com as formulações aniônicas associadas à iontoforese anódica (Figura 40) mostrou ativação de linfócitos T CD3 apenas com o marcador CD44 e só para os grupos de animais tratados com iontoforese anódica da OVA livre e encapsulada nos lipossomas aniônicos na ausência da NPAg. A iontoforese anódica dos lipossomas catiônicos contendo OVA, que estavam em concentração de OVA 20 vezes menor do que os lipossomas aniônicos não mostraram ativação dos linfócitos T (Figura 42). Também não foi possível observar nos grupos tratados com iontoforese anódica ativação de linfócitos TCD4. Salienta-se, no entanto, que os animais controle positivos, tratados com injeção subcutânea de OVA, também não apresentaram produção de linfócitos T maiores do que o controle negativo. Desta forma, parece que a iontoforese catódica das formulações induz uma resposta imune mais efetiva do que os tratamentos com iontoforese anódica e injeção subcutânea.

Com relação à população de células T CD8 não houve ativação desse perfil celular em nenhum dos grupos de animais estudados, incluindo a formulação administrada pela via subcutânea. As células T CD8 de memória podem matar as células infectadas e também podem fornecer proteção, tanto em modelos animais como em seres humanos, e, portanto, é

um tipo de célula importante gerada após a vacinação. Embora se tenha muito conhecimento sobre a geração de tais células de memória após a infecção com vírus ou bactérias, há muito menos apreciação de como essas células T CD8 de memória atuam na área de imunização (MACLEOD *et al.*, 2011).

Já com relação à população de linfócitos B (Figuras 39, 41 e 42), novamente a iontoforese catódica dos lipossomas que continham OVA foi o único tratamento que aumentou a expressão de CD19⁺ CD45⁺ quando comparada com o controle negativo e positivo (Figura 39). Porém, todas as formulações tratadas com iontoforese catódica e iontoforese anódica que continham 5 mg/mL de OVA induziram níveis de IgG1 semelhantes a injeção subcutânea (Figura 31). Mesmo o tratamento com os lipossomas catiônicos, que continham apenas 0,25 mg/mL de OVA, induziram resposta semelhante ao controle positivo quando os animais foram tratados com iontoforese anódica dos lipossomas catiônicos que continham NPAg (Figura 34). Sabe-se que a interação entre linfócitos T e B após a administração de vacinas é de extrema importância, pois as células T CD4, também denominados de linfócitos T *helper* auxiliam as células B a diferenciar-se em células produtoras de anticorpos no plasma, bem como nos centros germinais e também na produção de células B de memória, gerando uma resposta imune mais efetiva (LE ROUX; NIEDERGANG, 2012). Nem sempre, no entanto, é possível observar esta ativação, uma vez que ele pode ter ocorrido em maior intensidade nos linfonodos drenantes da pele, mas foram apenas quantificados no baço. Mas a geração dos anticorpos específicos ficou clara nos estudos de imunização humoral.

Como não foi possível observar a produção de células TCD4 com os animais tratados por iontoforese anódica, apesar da produção de IgG1 com este tratamento (Figura 31B), foi realizado experimentos de reestimulação com os grupos de animais que receberam a aplicação tópica de lipossomas aniônicos contendo OVA associada à iontoforese anódica. O controle positivo desses experimentos foi a injeção subcutânea da OVA encapsulada nesses lipossomas para garantir que qualquer resposta positiva referente a iontoforese fosse derivada deste tratamento e não da encapsulação (Figura 43). Apenas os animais estimulados com ConA mostraram alguma produção maior de células TCD4 (Figura 44). Como a estimulação com ConA é um estímulo celular geral, tanto para as que entraram em contato com o antígeno OVA, como para as que não entraram, não foi possível novamente verificar resposta imune celular com a iontoforese anódica. Mas para comprovar a resposta imune humoral, já observada anteriormente (Figura 31B), realizou-se novamente a dosagem de anticorpos IgG1

nesses grupos de animais. A expressão de títulos de IgG1 semelhante para o controle positivo e para os animais tratados com iontoforese anódica de lipossoma aniônico contendo OVA foi confirmada (Figura 45), indicando, portanto, a ativação da resposta imune humoral.

As citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-17 também foram determinadas no soro do grupo de animais tratados com iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos. O IFN- γ apresenta importante papel na modulação de quase todas as respostas imunes, tais como hematopoiese, diferenciação de células T, atividades antitumoral e antiviral. Promove a diferenciação de células T e B, facilitando a progressão das células T CD4⁺ para fenótipo tipo Th1 e a maturação de células T CD8⁺ (JUVET *et al.*, 2012). A IL-2 indica resposta imune via Th1 (MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2010). Não foi observado estímulo significativo de ambas citocinas. Os resultados obtidos com a IL-2 confirmam que a imunização transcutânea não ativa a via Th1, como observado na Figura 32 com os baixos índices de produção de IgG2.

A produção de IL-17 esta relacionada com resposta via Th17 e está relacionada com a memória imunológica e também à resposta celular contra patógenos (LIN; LIGHT; KHADER, 2010). Nenhum grupo de animais que receberam as formulações em estudo foi capaz de produzir essa citocina. Esse resultado indica mais uma vez a não participação da resposta celular nessas formulações associadas à iontoforese anódica.

Como a iontoforese catódica das formulações apresentou resultados positivos tanto de resposta humoral (Figura 31), como celular (Figura 36 e 38), IFN- γ e IL-2 também foram avaliados após esses tratamentos. Pode-se observar na Figura 49A que houve uma produção elevada de INF- γ nos grupos de animais que receberam lipossomas aniônicos por iontoforese catódica, confirmando a ativação da resposta celular observada anteriormente. No entanto, os animais que receberam a iontoforese catódica dos lipossomas na presença da NPAg apresentaram níveis muito baixos de INF- γ . É provável que a Ag tenha interferido nesta avaliação, impossibilitando a quantificação da citocina. Os resultados obtidos com a IL-2, positivos apenas para a administração subcutânea da OVA (Figura 49), confirmaram novamente a não ativação da via Th1 pela imunização transcutânea.

Finalmente, avaliou-se o recrutamento das células apresentadoras de antígenos (APCs) presentes no baço e nos linfonodos inguinais dos animais tratados com a iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos. As APCs, ou células dendríticas, desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imunológica. Estas células caracterizam-se pela capacidade de captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T. Após a interação com o antígeno, as APCs migram de modo seletivo, dos tecidos periféricos para os órgãos

linfóides secundários (linfonodo e baço), onde interagem com os linfócitos T, ativando-os e desencadeando a resposta imunológica. Durante este percurso, ocorre o processo de maturação, no qual as APCs processam o antígeno e apresentam-no à sua superfície, associado às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (LE ROUX & NIEDERGANG, 2012). Pode-se observar nas Figuras 51 e 52 que houve estímulo das APCs após a imunização transcutânea com a iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos contendo OVA. Salienta-se, no entanto, que modificações no intervalo entre a imunização e a eutanásia dos animais poderiam impactar em porcentagens ainda maiores de células dendríticas recrutadas após imunização transcutânea. Como não são encontrados na literatura estudos de imunização transcutânea por iontoforese decidiu-se realizar esta análise com intervalo de 3 dias. No entanto, estudos futuros devem ser realizados para padronizar o intervalo de tempo ideal para esta medida.

7. CONCLUSÃO

Os lipossomas aniônicos e catiônicos contendo OVA adicionados ou não de NPAG apresentaram tamanho, Pdl, potencial zeta e eficiência de encapsulação da proteína adequados para a proposta deste projeto. A OVA teve sua integridade mantida nos lipossomas e foi encapsulada provavelmente na bicamada lipídica dos mesmos. Os estudos de microscopia eletrônica de varredura sugeriram que o potencial zeta das dispersões lipossomais e a composição da bicamada lipídica alteraram a distribuição das NPAG nos lipossomas: os de caráter aniônico mantiveram as NPAG dispersas na fase aquosa externa, enquanto que os de caráter catiônico foram capazes de encapsular as NPAG na cavidade interna das vesículas. Os lipossomas mantiveram sua estabilidade física frente a aplicação da corrente elétrica. Nos estudos de penetração cutânea *in vitro*, os lipossomas direcionaram a OVA para a epiderme viável e a iontoforese aumentou significativamente a penetração cutânea da proteína, principalmente quando a mesma estava encapsulada nos lipossomas. Não foi possível observar diferenças na quantidade de OVA penetrada após iontoforese anódica e catódica dos lipossomas aniônicos contendo 5 mg/mL de OVA. No entanto, o coeficiente de penetração da OVA na epiderme viável a partir das formulações administradas por iontoforese foi 1,6 vezes maior para os lipossomas aniônicos em relação aos catiônicos. A presença das NPAG nos lipossomas aumentou 39 vezes o coeficiente de penetração dos lipossomas aniônicos em relação aos catiônicos. Nos experimentos de imunização transcutânea *in vivo* observou-se que a iontoforese anódica dos lipossomas aniônicos, catiônicos e da OVA livre não induziram resposta imune celular, mas induziram resposta imune humoral em intensidade semelhante a injeção subcutânea da OVA. Os estudos com os lipossomas catiônicos indicaram que a administração por iontoforese anódica de apenas 0,25 mg/mL de OVA foi capaz de estimular resposta imune humoral semelhante a injeção subcutânea da OVA e que as NPAG adicionadas a esses lipossomas penetraram na pele, pois funcionaram como adjuvantes imunológicos. Apesar desses resultados estimulantes obtidos com a iontoforese anódica dos lipossomas, foi a iontoforese catódica da OVA a partir dos lipossomas aniônicos, contendo ou não NPAG, a estratégia que mais contribuiu para a obtenção de uma resposta imune adequada, pois gerou não apenas resposta imune humoral efetiva mas também resposta imune celular efetiva. Além disso, a iontoforese catódica dos lipossomas aniônicos contendo OVA estimulou a produção de INF- γ e o recrutamento de células apresentadoras de antígeno, tanto no baço como nos linfonodos inguinais dos animais tratados. Desta forma, a associação de lipossomas e

iontoforose, principalmente a catódica, parece ser uma estratégia promissora para a imunização transcutânea.

8. REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução Re n. 899*, de 29/05/2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.
2. ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65, p. 36–48, 2013.
3. ARORA, A.; PRAUSNITZ, M. R.; MITRAGOTRI, S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 364, n. 2, p. 227–236, 2008.
4. AZIZI, A.; KUMAR, A.; DIAZ-MITOMA, F.; MESTECKY, J. Enhancing Oral Vaccine Potency by Targeting Intestinal M Cells. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 11, p. 1–7, 2010.
5. BABIUK, S.; BACA-ESTRADA, M.; BABIUK, L. A.; EWEN, C.; FOLDVARI, M. Cutaneous vaccination: the skin as an immunologically active tissue and the challenge of antigen delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 199–214, 2000.
6. BAL, S. M.; DING, Z.; RIET, E. V.; JISKOOT, W.; BOUWSTRA, J. A. Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? **Journal of Controlled Release**, v. 148, p. 266–282, 2010.
7. BANGA, A. K. Microporation applications for enhancing drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 6, n. 4, p. 343–354, 2009.
8. BANGA, A. K.; CHIEN, Y. W. Iontophoretic delivery of drugs: Fundamentals, developments and biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 7, n. 1, p. 1–24, 1988.
9. BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **J Mol Biol**. v. 8, p. 660–668, 1964.
10. BANZHOFF, A.; GASPARINI, R.; LAGHI-PASINI, F.; STANISCIA, T.; DURANDO, P.; MONTOMOLI, E.; CAPECCHI, P. L.; DI GIOVANNI, P.; STICCHI, L.; GENTILE, C.; *et al.* MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, e4384, 2009.

11. BARNIER-QUER, C.; ELSHARKAWY, A.; ROMEIJN, S.; KROS, A.; JISKOOT, W. Adjuvant effect of cationic liposomes for subunit influenza vaccine: influence of antigen loading method, cholesterol and immune modulators. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 392–410, 2013.
12. BARNIER-QUER, C.; ELSHARKAWY, A.; ROMEIJN, S.; KROS, A.; JISKOOT, W. Cationic liposomes as adjuvants for influenza hemagglutinin: more than charge alone. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 81, n. 2, 294–302, 2012.
13. BASTÚS, N. G.; SANCHEZ-TILLO, E.; PUJALS, S.; FARRERA, C.; KOGAN, M. J.; GIRALT, E.; *et al.* Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. **Mol. Immunol.**, 46, 743–748, 2009.
14. BASTÚS, N. G.; SÁNCHEZ-TILLÓ, E.; PUJALS, S.; FARRERA, C.; LÓPEZ, C.; GIRALT, E.; CELADA, A.; LLOBERAS, J.; PUNTES, V. Homogeneous Conjugation of Peptides onto Gold Nanoparticles Enhances Macrophage Response. **ACS Nano**, v. 3, n. 6, p. 1335–1344, 2009.
15. BEHERA, T.; SWAIN, P.; SAHOO, S. K. Antigen in chitosan coated liposomes enhances immune responses through parenteral immunization. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 907–914, 2011.
16. BERAN, J. Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and haemodialysis patients. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 8, p. 235–247, 2008.
17. BERGSTRAND, N.; ARFVIDSSON, M. C.; KIM, J. M.; THOMPSON, D. H.; EDWARDS, K. Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 104, p. 361–379, 2003.
18. BERLINER, M.N. Reduced skin hyperemia during tap water iontophoresis after intake of acetylsalicylic acid, **Am. J. Phys. Med. Rehab.** v.76, p. 482–487, 1987.
19. BHUVANA, M.; NARAYANAN, J. S.; DHARUMAN, V.; TENG, W.; HAHN, J. H.; JAYAKUMAR, K. Gold surface supported spherical liposome–gold nano-particle nano-composite for label free DNA sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 802–808, 2012.
20. BLACK, M.; TRENT, A.; TIRRELL, M.; OLIVE, C. Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on toll-like receptor agonists. **Expert Rev. Vaccines**, v. 9, n. 2, 157-173, 2010.

21. BODE, C.; ZHAO, G.; STEINHAGEN, F.; KINJO, T.; KLINMAN, D. M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 10, p. 499–511, 2011.
22. BOS, J. D.; KAPSENBERG, M.L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. **Immunology Today**, v. 14, p. 75–78, 1993.
23. BOTHUN, G. D. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. **Journal of nanobiotechnology**, p. 6–13, 2008.
24. BOUARAB, L.; MAHERANI, B.; KHEIROLOMOON, A.; HASAN, M.; ALIAKBARIAN, B.; LINDER, M.; TEHRANY, E. A. Influence of lecithin–lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 197–204, 2014.
25. BOYLE, J.; EASTMAN, D.; MILLAR, C.; CAMUGLIA, S.; COX, J.; PEARSE, M.; GOOD, J.; DRANE, D. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses. **Vaccine**, 25, p. 2541–2544, 2007.
26. BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 975–999, 2015.
27. BRGLES, M.; HABJANEC, L., HALASSY, B., TOMASI, J. Liposome fusogenicity and entrapment efficiency of antigen determine the Th1/Th2 bias of antigen-specific immune response. **Vaccine**, v. 27, p. 5435–5442, 2009.
28. BRGLES, M.; JURASIN, D.; SIKIRIC, M. D.; FRKANEC, R.; TOMASIC, J. Entrapment of Ovalbumin into Liposomes—Factors Affecting Entrapment Efficiency, Liposome Size, and Zeta Potential. **Journal of Liposome Research**, v. 18, p. 235–248, 2008.
29. BRITO, L. A.; O'HAGAN, D. T. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. **Journal of Controlled Release**, v. 190, 563–579, 2014.
30. BROWN, S. J.; MCLEAN, W. H. I. One remarkable molecule: filaggrin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 132, p. 751–762, 2012.
31. BUTTS, C.; MURRAY, R. N.; SMITH, C. J.; ELLIS, P. M.; JASAS, K.; MAKSYMIAK, A.; GOSS, G.; ELY, G.; BEIER, F.; SOULIÈRES, D. A. Multicenter Open-Label Study to Assess the Safety of a New Formulation of BLP25 Liposome Vaccine in Patients With

- Unresectable Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. **Clinical Lung Cancer**, v. 11, n. 6, p. 391–395, 2010.
32. CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of chromatography b biomedical sciences and applications**, v. 689, n.1, p. 175-180, 1997.
33. CHAIZE, B.; COLLETIER, J. P.; WINTERHALTER, M.; FOURNIER, D. Encapsulation of enzymes in liposomes: high encapsulation efficiency and control of substrate permeability. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 32, p. 67–75, 2004.
34. CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 299–311, 2010.
35. CHEN, D.; MAA, Y. F.; HAYNES, J. R. Needle-free epidermal powder immunization. **Expert Review Vaccines**, v. 1, n. 3, p. 265–76, 2002.
36. CHOPRA, A.; CEVC, G. Non-invasive, epicutaneous immunisation with toxoid in deformable vesicles protects mice against tetanus, chiefly owing to a Th2 response. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 55–64, 2014.
37. CLARES, B.; CALPENA, A. C.; PARRA, A.; ABREGO, G.; ALVARADO, H.; FANGUEIRO, J. F.; SOUTO, E. B. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p. 591–598, 2014.
38. CLARK, R. A.; CHONG, B.; MIRCHANDANI, N.; BRINSTER, N. K.; YAMANAKA, K.; DOWGIERT, R. K.; KUPPER, T. S.. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. **J. Immunol.**, v. 176, p. 4431–4439, 2006.
39. COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, p. 492–503, 2010.
40. COMBADIÈRE, B.; LIARD, C. Transcutaneous and intradermal vaccination. **Human Vaccines**, v. 7:8, p. 811–827, 2011.
41. COSCO, D.; PAOLINO, D.; MAIUOLO, J.; DI MARZIO, L.; CARAFA, M.; VENTURA, C. A.; FRESTA, M. Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of

- resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, p. 1–10, 2015.
42. CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **J Chem. Soc. Faraday T.**, v. 2, n. 75, p. 790–798, 1979.
43. CUBAS, R.; ZHANG, S.; KWON, S.; SEVICK-MURACA, E. M.; LI, M.; CHEN, C.; YAO, Q. Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. **J. Immunother.**, v 32, n. 2, p. 118–128, 2009.
44. DAHLAN, A.; ALPAR, H. O.; STICKINGS, P.; SESARDIC, D.; MURDAN, S. Transcutaneous immunisation assisted by low-frequency ultrasound. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 123–128, 2009.
45. DE LA PRESA, P.; RUEDA, T.; MORALES, M. D. P.; CHICHÓN, F. J.; ARRANZ, R.; VALPUESTA, J. M.; HERNANDO, A. Gold Nanoparticles Generated in Ethosome Bilayers, As Revealed by Cryo-Electron-Tomography. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 3051–3057, 2009.
46. DE ROSA, S. C. Vaccine applications of flow cytometry. **Methods**, v. 57, p. 383–391, 2012.
47. DUBEY, S.; KALIA, Y. N. Electrically-assisted delivery of an anionic protein across intact skin: cathodal iontophoresis of biologically active ribonuclease T1. **Journal of Controlled Release**, v. 152, p. 356–362, 2011.
48. DUPASQUIER, M.; STOITZNER, P.; VAN OUDENAREN, A.; ROMANI, N.; LEENEN, P. J. M. Macrophages and Dendritic Cells Constitute a Major Subpopulation of Cells in the Mouse Dermis. **J Investig Dermatol**, v. 123, p. 876–879, 2004.
49. DUTHIE, M. S.; WINDISH, H. P.; FOX, C. B; REED, S. G: Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. **Immunol Rev.**, v. 239, p. 178–196, 2010.
50. EDWARDS, D. A.; PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R.; WEAVER, C. Analysis of enhanced transdermal transport by skin electroporation. **Journal of Controlled Release**, v. 34, p. 211–221, 1995.

51. EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and Skin: From Drug Delivery to Model Membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 203–222, 2008.
52. ELMOSLEMANY, R. M.; ABDALLAH, O. Y.; EL-KHORDAGUI, L. K.; KHALAFALLAH, N. M. Propylene Glycol Liposomes as a Topical Delivery System for Miconazole Nitrate: Comparison with Conventional Liposomes. **AAPS Pharm Sci Tech.**, v. 13, p. 723–731.
53. ELNEKAVE, M.; FURMANOV, K.; NUDEL, I.; ARIZON, M.; CLAUSEN, B. E.; *et al.* Directly Transfected Langerin+ Dermal Dendritic Cells Potentiate CD8+ T Cell Responses following Intradermal Plasmid DNA Immunization. **J Immunol.**, v. 185: p. 3463–3471, 2010.
54. ENGELKE, L.; WINTER, G.; HOOK, S.; ENGERT, J. Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. **Vaccine**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.012>.
55. ESSA, E. A.; BONNER, M. C.; BARRY, B. W. Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. **International journal of pharmaceutics**, v. 240, p. 55–66, 2002.
56. FRECH, S. A.; DUPONT, H. L.; BOURGEOIS, A. L.; MCKENZIE, R.; BELKINDGERSON, J.; FIGUEROA, J. F.; *et al.* Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. **Lancet**, v. 371, p. 2019–2025, 2008.
57. GARDENIERS, J. G. E.; LÜTTGE, R.; BERENSCHOT, J. W.; BOER, M. J.; YESHURUN, Y.; HEFETZ, M.; OEVER, R. V.; BERG, A. Silicon micromachined hollow microneedles for transdermal liquid transport. **J. Microelectromech. Syst.**, v. 12, 855–862, 2003.
58. GEBHARDT, T.; WAKIM, L. M.; EIDSMO, L.; READING, P. C.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R.. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. **Nat. Immunol.**, v. 10, p. 524–530, 2009.
59. GHAFAR, K. A.; GIDDAM, A. K.; ZAMAN, M.; SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Liposomes as Nanovaccine Delivery Systems. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1194–1208, 2014.

60. GLENN, G. M.; RAO, M.; MATYAS, G. R.; ALVING, C. R. Skin immunization made possible by cholera toxin. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 851–852, 1998.
61. GLENN, G. M.; SCHARTON-KERSTEN, T.; ALVING, C. R. Advances in vaccine delivery: transcutaneous immunisation. **Expert Opin Investig Drugs**; v. 8, n. 6, p. 797–805, 1999.
62. GLIKFELD, P.; CULLANDER, C.; HINZ, R.S.; GUY, R.H. A new system for *in vitro* studies of iontophoresis. **Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 443–446, 1988.
63. GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.
64. GREEN, P. G. Iontophoretic delivery of amino acid derivatives across the skin *in vitro*. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 9, p. 1113–1120, 1991.
65. GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Lett.**, v. 14, p. 95–99, 1971.
66. GUO, L.; CHEN, J.; QIU, Y.; ZHANG, S.; XU, B.; GAO, Y. Enhanced transcutaneous immunization via dissolving microneedle array loaded with liposome encapsulated antigen and adjuvant. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n.1-2, p. 22–30, 2013.
67. GUY, R. H.; KALIA, Y. N.; DELGADO-CHARRO, M. B.; MERINO, V.; LOPEZ, A.; MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **J Control Release**, v. 64, n 1-3, p. 129–132, 2000.
68. HABJANEC, L.; FRKANEC, R.; HALASSY, B.; TOMAŠIC, J. Effect of Liposomal Formulations and Immunostimulating Peptidoglycan Monomer (PGM) on the Immune Reaction to Ovalbumin in Mice. **Journal of Liposome Research**, v. 16, p. 1–16, 2006.
69. HALPERIN, S. A.; DOBSON, S.; MCNEIL, S.; LANGLEY, J. M.; SMITH, B.; MCCALL-SANI, R.; LEVITT, D.; NEST, G.V.; GENNEVOIS, D.; EIDEN, J. J. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. **Vaccine**, 24, 20–26, 2006.

70. HAMMOND, S. A.; TSONIS, C. ; SELLINS, K. ; et al. Transcutaneous immunization of domestic animals: opportunities and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 45–55, 2000.
71. HAN, S. Clinical vaccine development. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 4, p. 46–53, 2015.
72. HANIFFA, M.; GUNAWAN, M.; JARDINE, L. Human skin dendritic cells in health and disease. **Journal of Dermatological Science**, v. 77, p. 85–92, 2015.
73. HARRIS, J. R. A comparative negative staining study of aqueous suspensions of sphingomyelin. **Micron and Microscopia Acta**, v. 17, n. 2, p.175–200, 1986.
74. HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nature immunology**, v. 14, 10, p. 978–985, 2013.
75. HENRI, S.; POULIN, L. F.; TAMOUTOUNOUR, S.; ARDOUIN, L.; GUILLIAMS, M.; DE BOVIS, B.; DEVILARD, E.; VIRET, C.; AZUKIZAWA, H.; KISSENPENNIG, A.; MALISSEN, B. CD207⁺ CD103⁺ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 207, p. 189–206, 2010.
76. HENRY, S.; MCALLISTER, D. V.; ALLEN, M. G.; PRAUSNITZ, M. R. Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 87, p. 922–925, 1998.
77. HUANG, C. M. Topical vaccination: the skin as a unique portal to adaptive immune responses. **Seminars in immunopathology**, v.29, p. 71-80, 2007.
78. HUANG, Y.; YU, F.; PARK, Y. S.; WANG, J.; SHIN, M. C.; CHUNG, H. S.; YANG, V. C. Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. **Biomaterials**, v. 31, p. 9086–9091, 2010.
79. HUANGA, J.; MEYER, C.; ZHU, C. T cell antigen recognition at the cell membrane. **Molecular Immunology**, v. 52, p. 155–164, 2012.
80. HUBER, L.A. **Influência da iontoforese na penetração de nanopartículas lipídicas sólidas em tumores cutâneos**. Ribeirão Preto: Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

81. IGYÁRTÓ, B. T.; KAPLAN, D. H. Antigen presentation by Langerhans cells. **Current Opinion in Immunology**, v.25, p.115–119, 2013.
82. JADOUL, A.; BOUWSTRA, J. A.; PREAT, V. Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum: review on the biophysical studies, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 35, p. 89–105, 1999.
83. JAZAYERI, S. D.; IDERIS, A.; ZAKARIA, Z.; SHAMELI, K.; MOEINI, H.; OMAR, A. R. Cytotoxicity and immunological responses following oral vaccination of nanoencapsulated avian influenza virus H5 DNA vaccine with green synthesis silver nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 116–123, 2012.
84. JOSEPH, A.; ITSKOVITZ-COOPER, N.; SAMIRA, S.; FLASTERSTEIN, O.; ELIYAHU, H.; SIMBERG, D.; GOLDWASER, I.; BARENHOLZ, Y.; KEDAR, E. A new intranasal influenza vaccine based on a novel polycationic lipid--ceramide carbamoyl-spermine (CCS) I. Immunogenicity and efficacy studies in mice. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3990–4006, 2006.
85. JUNG, S.; PATZELT, P. Strategy of topical vaccination with nanoparticles. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 2, p., 021001–021007, 2009.
86. JUVET, S. C.; HAN, M.; VANAMA, R.; JOE, B.; KIM, E. Y.; ZHAO, F. L.; JEON, C.; ADEYI, O.; ZHANG, L. Autocrine IFN γ Controls the Regulatory Function of Lymphoproliferative Double Negative T Cells. **Plos One**, v. 7, n. 10, e47732, 2012.
87. KAJIMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, M.; KIGASAWA, K.; KANAMURA, K.; HARASHIMA, H.; KOGURE, K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 57–65, 2011.
88. KALIA, Y. N.; NAIK, A.; GARRISON, J.; GUY, R. H. Iontophoretic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 619–659, 2004.
89. KANEDA, Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 43, n. 2-3, p. 197–205, 2000.
90. KANEKIYO, M.; WEI, C. J.; YASSINE, H. M.; MCTAMNEY, P. M.; BOYINGTON, J. C.; WHITTLE, J. R.; RAO, S. S.; KONG, W. P.; WANG, L.; NABEL, G. J. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. **Nature**, v. 499, 102–106, 2013.

91. KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Transcutaneous Immunization: An Overview of Advantages, Disease Targets, Vaccines, and Delivery Technologies. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 1, p. 175–201, 2010.
92. KARN, P. R.; CHO, W.; PARK, H. J.; PARK, J. S.; HWANG, S. J. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 365–377, 2013.
93. KENNEY, R. T.; CROSS, A. S (2010). Adjuvants for the future. In New Generation Vaccines, M.M. Levine, G. Dougan, M.F. Good, M.A. Liu, G.J. Nabel, J.P. Nataro, and R. Rappuoli, eds. (New York: Informa Healthcare USA, Inc.), p. 250–262.
94. KERSTEN, G.; HIRSCHBERG, H. Needle-free vaccine delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 4, p. 459–74, 2007.
95. KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H.; CHO, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 95–101, 2007.
96. KIRJAVAINEN, M.; URTTI, A.; JAASKELAINEN, I.; SUHONEN, T. M.; PARONEN, P.; VALJAKKA-KOSKELA, R.; KIESVAARA, M. J. Interactions of liposomes with human skin *in vitro*- the influence of lipid composition and structure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1304, p. 179–189, 1996.
97. KIRJAVAINEN, M.; URTTI, A.; VALJAKKA-KOSKELA, R.; KIESVAARA, J.; MONKKONEN, J. Liposome-skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. **Eur J Pharm Sci**, v. 7, p. 279–286, 1999.
98. KOHLI, A. K.; ALPAR, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n 1-2, p. 13–17, 2004.
99. KOUTSONANOS, D.G.; MARTIN, M.P.; ZARNITSYN, V.G.; SULLIVAN, S.P.; COMPANS, R.W.; PRAUSNITZ, M.R.; SKOUNTZOU, I. Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. **PLoS ONE**, v. 4, p. 47–73, 2009.
100. KOUVARIS, P.; DELIMITIS, A.; ZASPALIS, V.; PAPADOPOULOS, D.; TSIPAS, S. A.; MICHAELIDIS, N. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus Unedo* leaf extract. **Materials Letters**, v. 76, p. 18–20, 2012.

- 101.KUBO, A.; NAGAO, K.; YOKOUCHI, M.; SASAKI, H.; AMAGAI, M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. **J. Exp. Med.**, v. 206, p. 2937–2946, 2009.
- 102.KULKARNI, S. B.; BANGA, A. K.; BETAGERI, G. V.. Transdermal Iontophoretic delivery of colchicine encapsulated in liposomes. **Drug Delivery**, v. 3, n. 4, p. 245–250, 1996.
- 103.KUO, I. H.; YOSHIDA, T.; DE BENEDETTO, A.; BECK, L. A. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 131, p. 266–278, 2013.
- 104.KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 211–222, 2004.
- 105.LAMBRECHT, B. N.; KOOL, M.; WILLART, M. A.; HAMMAD, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, 23–29, 2009.
- 106.LASIC, D. D. **Liposome: from physics to applications**. New York: Editora Amsterdam, 1993.
- 107.LE ROUX, D.; NIEDERGANG, F. New insights into antigen encounter by B cells. **Immunobiology**, v. 217, p.1285–1291, 2012.
- 108.LI, N.; PENG, L. H.; CHEN, X.; NAKAGAWA, S.; GAO, J. Q. Transcutaneous vaccines: Novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers **Vaccine**, v. 29, p. 6179– 6190, 2011-A.
- 109.LI, N.; PENG, L. H.; CHEN, X.; NAKAGAWA, S.; GAO, J. Q. Effective transcutaneous immunization by antigen-loaded flexible liposome *in vivo*. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p. 3241–3250, 2011-B.
- 110.LIN, Y.; SLIGHT, S. R.; KHADER, S. A. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity *Semin Immunopathol*, v.2, p. 79–90, 2010.
- 111.LIPOID GmbH. Phase Transition Temperatures of LIPOID Lecithins and Phospholipids. **Informe técnico**. 2011.

- 112.LIVINGSTON, B. D.; LITTLE, S. F.; LUXEMBOURG, A.; ELLEFSEN, B.; HANNAMAN, D. Comparative performance of a licensed anthrax vaccine versus electroporation based delivery of a PA encoding DNA vaccine in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 28, n. 4, p. 1056–1061, 2010.
- 113.LOPEZ, R. F. V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica de câncer de pele. Ribeirão Preto: Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2000.
- 114.LOPEZ, R. F. V. ; BENTLEY, M. V. L. B. ; DELGADOCHARRO, M. B. ; GUY, R. H. Delivery of 5-aminolevulinic acid into the skin: iontophoresis versus chemical enhancement. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12. p. S-131, 2001.
- 115.LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M.V.L.B.; DELGADO-CHARRO, M. B.; SALOMON, D.; VAN DEN BERGH, H.; LANGE, N.; GUY, R. H. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. **Photochemistry Photobiology**, v. 77, p. 304–308, 2003.
- 116.LOPEZ, R. F. V.; LANGE, N.; GUY, R.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancer: Controlled Drug Delivery of 5-ALA and its esters. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 77–94, 2004.
- 117.LUTTGE, R.; BERG, A. V. D., ELWENSPOEK, M. Integrated lithographic molding for microneedle-based devices, **J. Microelectromech. Sys.**, v. 16, n. 4, p. 872–884, 2007.
- 118.MAADEN, K.; JISKOOT, W.; BOUWSTRA, J. Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 645–655, 2012.
- 119.MACLEOD, M. K. L.; MCKEE, A. S.; DAVID, A.; WANG, J.; MASON, R.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells, P. **Natl. Acad. Sci. USA**, v.108, p. 7914–7919, 2011.
- 120.MADNI, A.; SARFRAZ, M.; REHMAN, M.; AHMAD, M.; AKHTAR, N.; AHMAD, S.; TAHIR, N.; IJAZ, S.; AL-KASSAS, R.; LÖBENBERG, R. Liposomal Drug Delivery: A Versatile Platform for Challenging Clinical Applications. **J Pharm Pharm Sci.**, v. 17, n. 3, p. 401–426, 2014.

121. MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; KHEIROLOMOOM, A.; RESHETOV, V.; STEBE, M. J.; LINDER, M. Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. **Analyst**, v. 137, p. 773–786, 2012.
122. MANOLOVA, V.; FLACE, A.; BAUER, M.; SCHWARZ, K.; SAUDAN, P.; BACHMANN, M.F. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 5, 1404–1413, 2008.
123. MANOSROI, A.; JANTRAWUT, P.; AKIHISA, T.; MANOSROI, W.; MANOSROI, J. *In vitro* and *in vivo* skin anti-aging evaluation of gel containing niosomes loaded with a semi-purified fraction containing gallic acid from Terminalia chebula galls. **Pharm Biol.**, v. 49, n. 11, p. 1190–203, 2011.
124. MANSOURIAN, M.; BADIEE, A.; JALALI, S. A.; SHARIAT, S.; YAZDANI, M.; AMIN, M.; JAAFARI, M. R. Effective induction of anti-tumor immunity using p5 HER-2/neu derived peptide encapsulated in fusogenic DOTAP cationic liposomes co-administrated with CpG-ODN. **Immunology Letters**, v. 162, p. 87–93, 2014.
125. MARICICH, S. M.; WELLNITZ, S. A.; NELSON, A. M.; LESNIAK, D. R.; GERLING, G. J.; LUMPKIN, E. A.; ZOGHBI, H. Y. Merkel cells are essential for light-touch responses. **Science**, v. 324, p. 1580–1582, 2009.
126. MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 287–293, 2009.
127. MATSUO, K.; HIROBE, S.; OKADA, N.; NAKAGAWA, S. Frontiers of transcutaneous vaccination systems: Novel technologies and devices for vaccine delivery. **Vaccine**, v. 31, 2403–2415, 2013.
128. MATSUO, K.; OKAMOTO, H.; KAWAI, Y.; QUAN, Y.; KAMIYAMA, F.; HIROBE, S.; OKADA, N.; NAKAGAWA, S. Vaccine efficacy of transcutaneous immunization with amyloid β using a dissolving microneedle array in a mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 266, p. 1–11, 2014.
129. MATTHEOLABAKIS, G.; LAGOUMINTZIS, G.; PANAGIA, Z.; PAPADIMITRIOUC, E.; PARTIDOS, H. D.; AVGOUSTAKIS, K. Transcutaneous delivery of a nanoencapsulated antigen: Induction of immune responses. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 187–193, 2010.

- 130.MCALLISTER, D. V.; ALLEN, M. G.; PRAUSNITZ, M. R. Microfabricated microneedles for gene and drug delivery, **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 02, p. 289–313, 2000.
- 131.MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, p. 39–44, 2006.
- 132.MILLER, M. A; PISANI, E. The cost of unsafe injections. **Bull World Health Organ**, v. 77, n. 10, p. 808–11, 1999.
- 133.MISCHLER, R.; METCALFE, I.C. Inflexal®V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. **Vaccine**, v. 20, p. B17–B23, 2002.
- 134.MISHRA, D.; DUBEY, V.; ASTHANA, A.; SARAF, D. K.; JAIN, N. K. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. **Vaccine**, v. 24, p. 4847–4855, 2006.
- 135.MISRA, A.; GANGA, S.; UPADHYAY, P. Needle-free, non-adjuvanted skin immunization by electroporation-enhanced transdermal delivery of diphtheriatoxid and a candidate peptide vaccine against hepatitis B virus. **Vaccine**, v. 18, p. 517–23, 1999.
- 136.MITRAGOTRI, S. Immunization without needles. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 905–916, 2005.
- 137.MITTAL, A.; SCHULZE, K.; EBENSEN, T.; WEIßMANN, S.; HANSEN, S.; LEHR, C. M.; GUZMÁN, C. A. Efficient nanoparticle-mediated needle-free transcutaneous vaccination via hair follicles requires adjuvantation. **Nanomedicine**, v. 11, n. 1, p. 147–154, 2015.
- 138.MOHAMMED A. R.; BRAMWELL, V. W.; COOMBES, A. G. A.; PERRIE, Y. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. **Methods**, v. 40, p. 30–38, 2006.
- 139.MOZAFARI, M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.10, n. 4, p. 711–719, 2005.
- 140.MUFAMADI, M. S.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; DU TOIT, L. C.; MODI, G.; NAIDOO, D.; NDESENDO, V. M. K. A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. **J. Drug Deliv.**, v. 2011, p. 1–19, 2011.

- 141.NA, L.; MAO, S.; WANG, J.; SUN, W. Comparison of different absorption enhancers on the intranasal absorption of isosorbide dinitrate in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 397, p. 59 – 66, 2010.
- 142.NEELAND, M. R.; ELHAY, M. J.; NATHANIELSZ, J.; MEEUSEN, E. N. T.; DE VEER, M. J. Incorporation of CpG into a Liposomal Vaccine Formulation Increases the Maturation of Antigen-Loaded Dendritic Cells and Monocytes To Improve Local and Systemic Immunity. **J Immunol.**, v. 19, p. 3666–3675, 2014.
- 143.NESTLE, F.O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z; NICKOLOFF B.J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, 679–691, 2009.
- 144.NISHIKAWA, K.; ARAI, H.; INOUE, K. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 9, 5226–5231, 1990.
- 145.O'HAGAN, D. T.; OTT, G. S.; NEST, G. V.; RAPPUOLI, R.; GIUDICE, G. D. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 12, 13–30, 2013.
- 146.PAASONEN, L.; SIPIÄ, T.; SUBRIZI, A.; LAURINMÄKI, P.; BUTCHER, S. J.; RAPPOLT, M.; YAGHMUR, A.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. Gold-embedded photosensitive liposomes for drug delivery: Triggering mechanism and intracellular release. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 136–143, 2010.
- 147.PANCHAGNULA, R.; PILLAI, O.; NAIR,V. B.; RAMARAO, P. Transdermal iontophoresis revisited, **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 4, p. 468–473, 2000.
- 148.PARK, J. H.; ALLEN, M. G.; PRAUSNITZ, M. R. Biodegradable polymer microneedles: fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. **J Control Release**, v. 104, p. 51–66, 2005.
- 149.PARK, S. H.; OH, S. G.; MUN, J. Y.; HAN, S. S. Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 48, p. 112–118, 2006.
- 150.PATEL, H.; JOSHI, A.; JOSHI A.; STAGNI, G. Effect of microporation on passive and iontophoretic delivery of diclofenac sodium. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 11, p. 1–6, 2015.

151. PERRIE, Y.; FREDERIK, P.M.; GREGORIADIS, G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. **Vaccine**, v. 19, n. 23-24, p. 3301–3310, 2001.
152. PIERRE, M. B.; COSTA, I. S. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. **Arch Dermatol Res.**, v. 303, p. 607–621, 2011.
153. PIERRE, M. B.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M.; BENTLEY, M. V. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. **BMC Dermatol.**, v. 1, p. 1–5, 2001.
154. PIKAL, M. J. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, p. 281–305, 2001.
155. PODDA, A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine. **Vaccine**, v. 19, 2673–2680, 2001.
156. POLAT, B. E.; FIGUEROA, P. L.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Transport pathways and enhancement mechanisms within localized and non-localized transport regions in skin treated with low-frequency sonophoresis and sodium lauryl sulfate. **J. Pharm. Sci.**, p. 1–18, 2010.
157. PORNPATTANANANGKUL, D.; OLSON, S.; ARYAL, S.; SARTOR, M.; HUANG, C. M.; VECCHIO, K.; ZHANG, L. Stimuli-Responsive Liposome Fusion Mediated by Gold Nanoparticles. **ACS Nano**, v. 4, p. 1935–1942, 2010.
158. PORTOLÉS, P.; ROJO, J. M. The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 3290–3300, 2009.
159. POULIN, L. F.; HENRI, S.; BOVIS, B.; EVILARD, E.; KISSENPFENNIG, A.; MALISSEN, B. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 3119–3131, 2007.
160. PRABHU, P.; PATRAVALE, V.; JOSHI, M. Nanocarriers for Effective Topical Delivery of Anti-Infectives. **Current Nanoscience**, v. 8, 491–503, 2012.
161. PULENDRAN, B.; OH, J. Z. NAKAYA, H.; RAVINDRAN, R.; KAZMIN, D. A. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. **Immunol Rev.**, v. 255, n. 1, p. 243–255, 2013.

- 162.PULENDRAN, B.; POWELL, J.; FLAVELL, R. A. (2010). Modulating vaccine responses with innate immunity. In *New Generation Vaccines*, M.M. Levine, G. Dougan, M.F. Good, M.A. Liu, G.J. Nabel, J.P. Nataro, and R. Rappuoli, eds. (New York: Informa Healthcare USA, Inc.), pp. 183–190.
- 163.QUAN, F. S.; KIM, Y. C.; COMPANS, R. W.; PRAUSNITZ, M. R.; KANG, S. M. Dose sparing enabled by skin immunization with influenza virus-like particle vaccine using microneedles, **J. Control. Release**, v. 147, p. 326–332, 2010.
- 164.RAHMAN, Y. E.; ROSENTHAL, M. W.; CERNY, E. A.; MORETTI, E. S. Preparation and prolonged tissue retention of liposome encapsulated chelating agents. **J Lab Clin Med.**, v. 83, p.640–647, 1974.
- 165.RAMON, G. Procédées pour accroître la production des antitoxines. **Annales de l’Institut Pasteur**, v. 40, p. 1–10, 1926.
- 166.RAMON, G. Sur l’augmentation anormale de l’antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. **Bulletin de la Société Central de Medecine Veterinaire**, v. 101, p 227–234, 1925.
- 167.REDDY, S. T.; VAN DER VLIES, A. J.; SIMEONI, E.; ANGELI, V.; RANDOLPH, G. J.; O’NEIL, C. P.; LEE, L. K.; SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. **Nat. Biotech.**, v. 25, n. 10, p. 1159–1164, 2007.
- 168.RIAZ, M. Liposomes preparation methods. **Pak J Pharm Sci.**, v. 19, p. 65–77, 1996.
- 169.RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- 170.RODRIGUES, C. A. **Aplicações de processamento e análise avançada de imagens para a caracterização de imagens de microscopia de força atômica**. 2003. 154f. Tese (Doutorado em física aplicada). Instituto de física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- 171.ROLDAO, A.; MELLADO, M. C.; CASTILHO, L. R.; CARRONDO, M. J.; ALVES, P. M. Virus-like particles in vaccine development. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 9, p. 1149–1176, 2010.

- 172.ROMANI, N.; CLAUSEN, B.; STOITZNER, P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. **Immunological Reviews**, v. 234, p. 120–141, 2010.
- 173.ROOIJEN, N.; NIEUWMEGEN, R. Liposomes in immunology: multilamellar phosphatidylcholine liposome as a simple biodegradable and harmless adjuvant without any immunogenic activity of its own. **Immunol commun.**, v. 9, p. 243–256, 1980.
- 174.ROSENKRANDS, I.; VINGSBO-LUNDBERG, C.; BUNDGAARD, T. J.; LINDENSTRØM, T.; ENOUF, V.; WERF, S.; ANDERSEN, P.; AGGER, E. M. Enhanced humoral and cell-mediated immune responses after immunization with trivalent influenza vaccine adjuvanted with cationic liposomes. **Vaccine**, v. 29, p. 6283– 6291, 2011.
- 175.ROTH, Y.; CHAPNIK, J.S.; COLE, P. Feasibility of aerosol vaccination in humans. **Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**, v. 112, n. 3, p. 264–70, 2003.
- 176.ROUSTIT, M.; BLAISE, S.; CRACOWSKI, J. L. Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 77, n. 1, p. 63–71, 2013.
- 177.RUOZI, B.; TOSI, G.; LEO, E.; VANDELLI, M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, p. 12–22, 2007.
- 178.SAEKI, H.; MOORE, A. M.; BROWN, M. J.; HWANG, S. T. Cutting edge: secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. **J Immunol**, v. 162, n. 5, p. 2472–2475, 1999.
- 179.SAHDEV, P.; PODARALLA, S.; KAUSHIK, R. S.; PERUMAL, O. Calcium phosphate nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery. **J Biomed Nanotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 132–41, 2013.
- 180.SAMANTA, S.; STIBAN, J.; MAUGEL, T. K.; COLOMBINI, M. Visualization of ceramide channels by transmission electron microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 1196–1201, 2011.
- 181.SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 370–377, 2013.

- 182.SAXENA, A.; TRIPATHI, R. M.; ZAFAR, F.; SINGH, P. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 67, p. 91–94, 2012.
- 183.SCHARTON-KERSTEN, T.; YU, J.; VASSELL, R.; O'HAGAN, D.; ALVING, C. R.; GLENN, G. M. Transcutaneous immunization with bacterial ADPribosylating exotoxins, subunits, and unrelated adjuvants. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5306–5313, 2000.
- 184.SCHENTEN, D.; MEDZHITOV, R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. **Adv. Immunol.**, 109, p. 87–124, 2011.
- 185.SCHMID, M. H.; KORTING, H. C. Therapeutic Progress with topical liposome drugs for skin disease. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 18, p. 335–342, 1996.
- 186.SCHOELLHAMMER, C. M.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Skin Permeabilization for Transdermal Drug Delivery: Recent Advances and Future Prospects. **Expert Opin Drug Deliv.**, v. 11, n. 3, p. 393–407, 2014.
- 187.SCHRAMLOVA, J.; BLAZEK, K.; BARTACKOVA, M.; OTOVA, B.; MARDESICOVA, L.; ZIZKOVSKY, V.; HULINSKA, D. Electron microscopic demonstration of the penetration of liposomes through skin. **Folia biologica**, v. 43, n. 4, 165–169, 1997.
- 188.SCHWARCKE, M.; MARQUES, T.; NICOLUCCI, P.; BAFFA, O. Silver Nanoparticle Added to Nuclear Medicine: A Preliminary Evaluation of Dose Increase in Iodine Therapy Assessed by Monte Carlo. **Med. Phys.**, v. 37, p. 3173, 2010.
- 189.SCHWARZ, T. F.; HORACEK, T.; KNUF, M.; DAMMAN, H. G.; ROMAN, F.; DRAME, M.; GILLARD, P.; JILG, W. Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults. **Vaccine**, v. 27, 6284–6290, 2009.
- 190.SEID JR, R. C.; LOOK J. L.; RUIZ, C.; FROLOV, V.; FLYER, D.; SCHAFER, J.; ELLINGSWORTH, L. Transcutaneous immunization with Intercell's vaccine delivery system. **Vaccine**, v. 30, p. 4349–4354, 2012.
- 191.SEO, N.; TOKURA, Y.; NISHIJIMA, T.; HASHIZUME, H.; FURUKAWA, F.; TAKIGAWA, M. Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 371–376, 2000.

- 192.SIEGRIST, C. A. Vaccine immunology. In *Vaccines*. 5th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier. Ed.S Plotkin, W Orenstein, P Offit, 2008, pp. 17–36.
- 193.SKOUNTZOU, I.; QUAN, F. S.; JACOB, J.; COMPANS, R. W.; KANG, S. M. Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses. **Vaccine**, v. 24, p. 6110–6119, 2006.
- 194.SOENEN, S. J. H.; BRISSON, A. R.; DE CUYPER, M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. **Biomaterials**, v. 30, n. 22, 3691–3701, 2011.
- 195.STEIN, P.; GOGOLL, K.; TENZER, S.; SCHILD, H.; STEVANOVIC, S.; LANGGUTH, P.; RADSACK, M. P. Efficacy of Imiquimod-Based Transcutaneous Immunization Using a Nano-Dispersed Emulsion Gel Formulation. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.
- 196.STREILEIN, J. W. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. **J Invest Dermatol.**, 80 Suppl:12s–6s, 1983.
- 197.STREILEIN, J. W.; LONSBERRY, L. W.; BERGSTRESSER, P. R. Depletion of epidermal langerhans cells and Ia immunogenicity from tape-stripped mouse skin. **J Exp Med.**, v. 155, p. 863–71, 1982.
- 198.SUH, J. S.; DILELLA, D. P.; MOSKOVITS, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy of colloidal metal systems: a two-dimensional phase equilibrium in p-aminobenzoic acid adsorbed on silver. **J. Phys. Chem.**, v. 87, p. 1540–1544, 1983.
- 199.TANG, H.; MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-Frequency Sonophoresis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 5, p. 531–666, 2001.
- 200.TAVEIRA, S. F.; DE SANTANA, D. C.; ARAÚJO, L. M.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles. **J Biomed Nanotechno**, v. 10, n. 7, p. 1382–90, 2014.
- 201.TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535–552, 2004.

202. TEZEL, A.; MITRAGOTRI, S. Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 3502–12, 2003.
203. TEZEL, A.; PALIWAL, S.; SHEN, Z.; MITRAGOTRI, S. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. **Vaccine**, v. 23, n. 29, p. 3800–3807, 2005.
204. TOMAI, M. A.; VASILAKOS, J. P. TLR-7 and -8 agonists as vaccine adjuvants. **Expert Rev Vaccine**, v. 10, p. 405–407, 2011.
205. TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews drug discovery**, v. 4, p. 145–160, 2005.
206. TOULON, A.; JAMESON, J.; BHAVSAR, D.; TENENHAUS, M.; RUDOLPH, R.; GUENICHE, A.; BRETON, L.; HAVRAN, W. A role for human skin-resident T cells in wound healing. **J. Exp. Med.**, v. 206, p. 743–750, 2009.
207. TRENTINI, M. M.; OLIVEIRA, F. M.; GAETI, M. P. N.; BATISTA, A. C.; LIMA, E. M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Microstructured liposome subunit vaccines reduce lung inflammation and bacterial load after *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Vaccine**, v. 32, p. 4324–4332, 2014.
208. TSUYOSHI, I.; ESTEBAN, C. Transcutaneous Immunization with Cytotoxic T Cell Peptide Epitopes Provides Effective Antitumor Immunity in Mice. **Journal of Immunotherapy**, v. 28, n. 5, p. 430–437, 2005.
209. United States Food and Drug Administration (US-FDA); **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**, 2001.
210. VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26–31, 2007.
211. VALLADEAU, J.; RAVEL, O.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; MOORE, K.; KLEIJMEER, M., et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. **Immunity**, v. 12, p. 71–81, 2000.
212. VARYPATAKI, E. M.; MAADEN, K. V. D.; BOUWSTRA, J.; OSSENDORP, F.; JISKOOT, W. Cationic Liposomes Loaded with a Synthetic Long Peptide and Poly(I:C):

- a Defined Adjuvanted Vaccine for Induction of Antigen-Specific T Cell Cytotoxicity. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 216–226, 2015.
- 213.VASAN, S.; HURLEY, A.; SCHLESINGER, S. J; *et al.* In Vivo Electroporation Enhances the Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine Candidate in Healthy Volunteers. **PLoS ONE**., v. 6, n. 5, e19252, 2011.
- 214.VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **Int. J. Pharm.**, v. 258, n. 1–2, 141–151, 2003.
- 215.VICTOR, J. R.; FUSARO, A. E.; DUARTE, A. J. S.; SATO, M. N. Preconception maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 269–277, 2003.
- 216.VUTLA, N. B.; BETAGERI, G. V.; BANGA, A. K. Transdermal iontophoretic delivery of enkephalin formulated in liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 5–8, 1996.
- 217.WAGNER, A.; VORAUER-UHL, K. Liposome Technology for Industrial Purposes. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- 218.WANG, J.; HU, J. H.; LI, F. Q.; LIU, G. Z.; ZHU, Q. G.; LIU, J. Y.; MA, H. J.; PENG, C.; SI, F. G. Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA–cationic deformable liposome complex. **Experimental Dermatology**, v. 16, p. 724–729, 2007.
- 219.WEIJERS, M.; VISSCHERS, R. W. Light Scattering Study of Heat-Induced Aggregation and Gelation of Ovalbumin. **Macromolecules**, v. 35, p. 4753–4762, 2002.
- 220.WILLIAMS, A. Transdermal and topical drug delivery from theory to clinical practice. London: Pharmaceutical Press; 2003.
- 221.XU, Y.; TANG, H.; LIU, J. H.; WANG, H.; LIU, Y. Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology Letters**, v. 219, n. 1, p. 42–48, 2013.
- 222.YAN, W.; HUANG, L. The effects of salt on the physicochemical properties and immunogenicity of protein based vaccine formulated in cationic liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 56–62, 2009.

223. YUAN, T. F. Noninvasive vaccination: From the perspective of sonoporation. **Vaccine**, v. 26, p. 4109–4110, 2008.
224. ZHAO, Y. L.; MURTHY, S. N.; MANJILI, M. H.; GUAN, L. J.; SEN, A.; HUI, S. W. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by electroporation-enhanced needle-free skin immunization. **Vaccine**, v. 24, n. 9, p. 1282–1290, 2006.
225. ZOLLINGER, W. D.; BABCOCK, J. G.; MORAN, E. E.; BRANDT, B. L.; MATYAS, G. R.; WASSEF, N. M.; ALVING, C. R. Phase I study of a *Neisseria meningitidis* liposomal vaccine containing purified outer membrane proteins and detoxified lipooligosaccharide. **Vaccine**, v. 30, p. 712–721, 2012.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1052.53.9), intitulado "Influência da Iontoforese na Imunização Transcutânea Utilizando Lipossomas e Nanopartículas Metálicas", de autoria de **Daniela Spuri Bernardi** e de **Renata Fonseca Vianna Lopez**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.12.2012.

Colaboradora: Lúcia Helena Faccioli

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1052.53.9), entitled: "Influência da Iontoforese na Imunização Transcutânea Utilizando Lipossomas e Nanopartículas Metálicas", by **Daniela Spuri Bernardi** and **Renata Fonseca Vianna Lopez**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December, 10 2012.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro