UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós – Graduação em Tecnologia

Bioquímica – Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Jony Takao Yoshida

Nanopartículas de Quitosana Como Veículo de Vacinação Contra a Hepatite B por via Nasal

Dissertação para obtenção de grau
de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio
Stephano

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Y65n Yoshida, Jony Takao
Nanopartículas de quitosana como veículo de vacinação contra a hepatite B por via nasal / Jony Takao Yoshida. -- São Paulo, 2012.
52p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Stephano, Marco Antonio

I. Vacina : Farmacologia 2. Materiais nanoestruturados I. T.
II. Stephano, Marco Antonio, orientador.

615.372 CDD

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível na faculdade de ciências farmacêuticas no departamento de tecnologia bioquímica e farmacêutica.

Jony Takao Yoshida

Nanopartículas de Quitosana Como Veículo de Vacinação Contra a Hepatite
B por via Nasal

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, _____ de 2012.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Stephano, pela orientação, apoio, ensino e paciência durante toda a realização deste trabalho de mestrado.

À Elisabeth C. N. Tenório, do INSTITUTO BUTANTAN, pela gentileza no fornecimento dos antígenos necessário para a realização desta dissertação.

Aos Prof. João Carlos Monteiro de Carvalho, Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr. e ao Prof. Pitombo e seu alunos, pela disponibilização dos equipamentos de seus laboratórios e auxílio na em diversos problemas.

Aos colegas de laboratório Patrícia, Laura, Marnen e Fernanda pela ajuda, no ensinamento, resolução de problemas de diversos procedimentos do laboratório.

Ao Dr, Denis, da Faculdade de Engenharia Química da USP, por possibilitar a utilização de seus equipamentos, utilizados em minhas análises.

Ao especialista de laboratório Dr. Dante e o técnico de laboratório, Anderson, pelo auxílio durante todo o mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro, fornecendo a bolsa de estudos.

À minha família pela grande apoio e paciência durante essa fase.

YOSHIDA, J.T. **Nanopartículas de Quitosana Como Veículo de Vacinação Contra a Hepatite B por via nasal**. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

RESUMO

A imunização por via nasal pode representar uma alternativa as imunizações intramusculares, pois a aplicação por essa rota não é invasiva e há fácil acesso da vacina à mucosa. Além disso, a mucosa nasal apresenta diversas características que podem favorecer a imunização, por exemplo, há uma grande área superficial altamente vascularizada disponível para a absorção dos antígenos. Outra característica fundamental é a capacidade da mucosa de responder a antígenos, através das células imunocompetentes presentes, como as células M e dendríticas. Apesar disso, outros métodos podem ser empregados para melhorar absorção e disponibilidade dos antígenos pela mucosa, como a utilização de polímeros biodegradáveis. Entre estes, a quitosana é um biopolímero, derivado da desacetilação da quitina, que tem como principal característica, a possibilidade de estrutura-los em nanopartículas. Outra característica importante é sua propriedade catiônica a qual possibilita a sua ligação a proteínas e também à mucosa, que provoca maiores taxas de retenção de antígenos pela mucosa. Assim, neste trabalho, foi avaliado a imunogenicidade da inoculação do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), via mucosa nasal em camundongos, os quais produziram anticorpos IgG contra HBsAg, apresentaram aumento da secreção de IgA pela mucosa nasal, e também ao avaliar a resposta de citocinas em células RAW 264.7, houve secreção de TNF- α .

PALAVRAS CHAVE: nanopartículas, quitosana, mucosa, nasal, hepatite B

YOSHIDA, J.T. **Chitosan Nanoparticle as intranasal immunization vehicle of hepatites B vaccine**. 2012. 56 p. Master dissertation – Pharmaceutical Science College, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Abstract

The nasal vaccination is not invasive since its do not require needles for your application and your administration for is easy, thus the immunization via nasal route could be an alternative to intramuscular immunizations. Furthermore, the nasal mucosa has several characteristics like highly vascularized surface area available for absorption of antigen that could elicited the mucosal immune response caused by the competents cell available on the mucosal tissue. Nevertheless, other methods can be employed to improve absorption and availability of antigens to the mucosa, such as the use of nanoparticles of chitosan. Chitosan is a biopolymer product of deacetylation reaction of chitin, that has as main characteristic, the moldability, which enables the production of nanoparticles and its cationic property which allows its binding to proteins and also to the mucosa, which would lead to higher rates of absorption of antigens through the nasal mucosa. Thus, this work investigated the immunogenicity of the administration nanoparticles of chitosan with the surface antigen of hepatitis B (HBsAg) via the nasal mucosa in mice, which show levels of IgA in nasal lavages and serum IgG, as well as cytokines such as TNF- α released by RAW 264.7 cells of mice.

Keywords: nanoparticle, chitosan, mucosa, nasal, hepatitis B

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APRIL	Um sinal indutor de proliferação
BAFF	Fator de ativação de célula B da família TNF
BALT	Tecido linfoide associado a mucosa pulmonar
GM-CSF	Fator de crescimento de macrófagos
HBsAg	Antígeno de Superfície do vírus da hepatite B
IDP	Índice de polidispersão
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
MALT	Tecido linfoide associado a mucosa
NALT	Tecido linfoide associado a mucosa nasal
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato
PEG	Polietileno glicol
PLA	Ácido polilático
PLGA	poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
slgA	Imunoglobulina A de superfície
slgM	Imunoglobulina M de superfície
TNF	Fator de necrose tumoral
TPP	Tripolifosfato de sódio
VLP	<i>Vírus like particle</i>

SUMÁRIO

Agradecimentos	4
RESUMO	5
Abstract	6
Lista de abreviaturas e siglas	7
Sumário.....	8
1. Introdução	10
1.1. Quitosana.....	12
1.2. Mucosa.....	14
1.3. Sistema imune da mucosa	16
2. Justificativa	20
3. Objetivos.....	21
4. Materiais e Métodos.....	22
4.1. Nanopartículas de quitosana	22
4.1.1. Preparação e carregamento	22
4.1.2. Caracterização	23
4.2. Imunização	24
4.3. Coleta.....	25
4.3.1. Soro.....	25
4.3.2. Secreção nasal	26
4.4. Elisa (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)	26
4.5. Teste <i>in vitro</i> com células RAW 264.7	28
4.5.1. Teste de óxido nítrico	28
4.6. Métodos Estatísticos	29
5. Resultados e Discussão.....	30
5.1. Nanopartícula de Quitosana.....	30
5.1.1. Nanopartícula de quitosana com HBsAg	33

5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura	35
5.2. <i>Teste de Elisa de IgG sério</i>	37
5.3.3. Teste de Elisa para IgG1 e IgG2a.	40
5.2. <i>Teste de Elisa de IgA</i>	42
5.3. <i>Testes in-vitro</i>	43
5.3.1. Teste de óxido nítrico	43
5.3.2. Teste de elisa para TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10	43
Gráfico 5. Resposta de TNF-α	44
6. Conclusão	46
Referências bibliográficas	47
Referências bibliográficas	47
7. ANEXOS	54
7.1. <i>Antígeno recombinante do vírus da hepatite B.</i>	54
7.2. <i>Certificado da Comissão de ética no uso de animais</i>	55

1. Introdução

A hepatite B é uma doença causada por um vírus de DNA dupla fita, pertencente à família *Hepadnaviridae*, esse é composto por uma camada de lipoproteína, que apresenta 3 glicoproteínas de envelope L, S, M (representado pela figura 1) e um capsídeo nuclear, que contém o DNA viral associado à polimerase (PROTZER;

Figura 1: Vírus da hepatite B. (PROTZER e SCHALLER, 2000).
SCHALLER, 2000).

A doença pode se manifestar em duas formas, a aguda e a crônica, que se diferem pelos sintomas pós-infecção pelo vírus.

Na forma aguda, os indivíduos podem apresentar sintomas como fadiga, náusea, icterícia e falha aguda do fígado em casos mais graves, e na forma crônica, podem ocorrer quadros assintomáticos tal como sintomas como a cirrose hepática, sendo o prognóstico, diretamente afetado pela gravidade da doença (LIANG, 2009). Na forma aguda, o vírus é eliminado do organismo pelo sistema imune, porém na forma crônica, o sistema imune do indivíduo infectado não responde corretamente contra o antígeno (JAN *et al.*, 2011).

A infecção pelo vírus ocorre pelo contato sanguíneo ou de fluidos corporais de indivíduos infectados, via mucosa durante contato sexual, ou durante o parto, ou através de transfusões sanguíneas (LEBRE *et al.*, 2010). O seu período média de incubação é de 2 a 3 meses, podendo variar de 1 a 6 mês (LIANG, 2009)

A vacina contra a doença, até o presente momento, é realizada pela inoculação, por via parenteral, da proteína recombinante, do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), produzido por leveduras, aprovado para o uso em 1986 (LEBRE *et al.*, 2010).

Os métodos de imunização da vacina atualmente aprovado são compostos principalmente pela injeção parental da vacina, porém há outras metodologias como as vacinas contra a pólio, cólera, febre tifoide, rotavírus e influenza, que são aplicadas por via oral, com exceção do último que também pode ser aplicada por via nasal (BORGES *et al.*, 2010).

A vacinação via parenteral não consegue produzir uma proteção satisfatória na mucosa, a principal porta de entrada para vírus e bactérias (LEBRE *et al.*, 2010), ao contrário da vacinação via oral, nasal ou vagina, que podem oferecer proteção necessária ao organismo contra diversos patógenos, que tem como porta de entrada essas vias (NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006).

A imunização via mucosa apresenta diversas vantagens em relação à via parenteral, como a ausência de agulhas para a aplicação, que diminui o risco de contágio do administrador da vacina com sangue de outros indivíduos, e devido à aplicação não invasiva, haveria um maior número de adeptos da vacinação (MEDINA; GUZMÁN, 2001).

Para conferir uma boa proteção, as vacinas de mucosas devem penetrar no tecido e estimular o sistema imune inato e adaptativo (CHEN, K.; CERUTTI, 2010). Para alcançar esse objetivo estratégias foi pesquisada como a utilização de sistemas de entrega de antígeno a mucosa como a utilização de lipossomos (GUPTA; VYAS, SURESH, 2011), vetores bacteriais (MEDINA; GUZMÁN, 2001), partículas

virais (VLP) (PAREZ *et al.*, 2006) e partículas poliméricas (SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

Nos sistemas de entregas via partículas poliméricas há estudos que utilizaram diversos polímeros como os sintéticos, PLG (STANLEY *et al.*, 2004), PLGA (JAGANATHAN; VYAS, SURESH, 2006) e PEG/PLA (JAIN *et al.*, 2010), e polímeros naturais como a quitosana.

1.1. Quitosana

A quitina e a quitosana, são biopolímeros formados por unidades monoméricas de $\beta - (1 \rightarrow 4) - 2 - \text{amino} - 2 - \text{desoxi} - D - \text{glicose}$ e $\beta - (1 \rightarrow 4) - 2 - \text{acetamida} - 2 - \text{desoxi} - D - \text{glicose}$. A quitina é obtida do exoesqueleto de artrópodes e da parede celular de fungos, no entanto, a quitosana é obtida pela reação de desacetilação em meio básico da quitina, a qual é somente considerada quitosana, quando o grau de desacetilação da quitina for superior a 50%, ou seja, quando as unidades $\beta - (1 \rightarrow 4) - 2 - \text{amino} - 2 - \text{desoxi} - D - \text{glicose}$ forem predominante no biopolímero (BARROS ET AL., 2006; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; RINAUDO, 2006; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; TORRES *et al.*, 2005).

A quitosana apresenta caráter básico, devido aos agrupamentos aminas, sendo insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas como, por exemplo, de ácidos acético, fórmico, cítrico e clorídrico (SANTOS, *et al.*, 2003; SINHA *et al.*, 2004).

A solubilidade do biopolímero esta relacionada ao fenômeno de protonamento dos agrupamentos amina (ANDREWS *et al.*, 2009). A propriedade poli – catiônica da quitosana permite a moldagem em diversas formas como membranas, géis, esferas e cápsulas, quando estão em soluções ácidas (TORRES *et al.*, 2005).

Vários estudos são feitos com a utilização da quitosana, como na regeneração de tecidos, adsorção de moléculas e metais, como agente bactericida, e entre outros (RINAUDO, 2006).

Dentre esses, há estudos que investigaram o potencial da utilização da quitosana como veículo de transporte de fármacos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), imunógenos (PREGO *et al.*, 2010) e como adjuvante vacinal (ZAHAROFF *et al.*, 2007). Devido à sua natureza atóxica e biodegradabilidade, a quitosana pode ser considerada um ótimo excipiente para essas finalidades (ALHALAWEH *et al.*, 2009).

As características fundamentais para a escolha da quitosana, como um veículo de transporte de antígenos, são: sua capacidade de ligar a diversas substâncias, como proteínas e genes (ISSA *et al.*, 2005), sua propriedade adesiva e absorviva às camadas mucosas, presentes no trato digestivo e nas vias aéreas (ILLUM, L. *et al.*, 2001; KANG, M. L. *et al.*, 2009).

A muco- adesividade da quitosana pode ser atribuída à interação eletrostática entre os agrupamentos aminas, carregados positivamente, com os resíduos, negativamente carregados, de ácidos siálicos das glicoproteínas que estão presentes no muco e na membrana celular (AMIN *et al.*, 2009; SINHA *et al.*, 2004). No epitélio, a quitosana pode provocar alterações das junções intracelulares da mucosa pela redistribuição das proteínas das junções intracelulares, a qual abre reversivelmente essas ligações do epitélio, possibilitando a passagem da quitosana pela mucosa (VLLASALIU *et al.*, 2010), via rota paracelular (CANO-CEBRIÁN *et al.*, 2005), e assim permitindo o aumento da absorção do veículo de entrega (YU *et al.*, 2004).

Dias e colaboradores (2008), citaram algumas desvantagens da quitosana, como a baixa área superficial do polímero, o que acarretaria uma limitada disponibilidade de acesso dos sítios de ligação, os agrupamentos amina, a proteína desejada e a mucosa.

Porém, como foi citado anteriormente, a quitosana pode ser moldada em diversas formas pela reticulação dessa, como esferas, sendo possível manufacturar partículas de escalas nanométricas (TANG *et al.*, 2006), as quais demonstrariam uma alta área superficial e pequeno volume, assim resolvendo o problema de baixa disponibilidade dos sítios de ligação.

A alta área superficial das nanopartículas melhoraria a absorção pela mucosa pois perturbaria a camada de muco, pela ligação desse às nanopartículas, e assim expondo o epitélio para as outras partículas (MCGILL; SMYTH, 2010).

O pequeno tamanho das partículas provém outra característica, auxiliar na absorção da proteína associada a essas partículas à mucosa, pois moléculas menores teriam maior facilidade de atravessar a mucosa (PATTANI *et al.*, 2009).

O sistema de entrega utilizando nanopartículas de quitosana aumentam o tempo de residência na mucosa nasal tal como aumentam a absorção dos antígenos pelas células epiteliais e células M (AMIDI *et al.*, 2010).

1.2. Mucosa

As mucosas apresentam em sua camada epitelial (figura 2), células de goblet e epiteliais, localizadas próximas ao lúmen, e basais que são localizadas mais próximas à lâmina própria do tecido, acima da membrana basal (MARTTIN *et al.*, 1998),

As células epiteliais são unidas por junções intracelulares chamadas junções apertadas e junções aderentes, os quais seletivamente permitem a entrada de substâncias do lúmen ao estroma via rota paracelular, e apresentam cílios que renovam o muco por batimentos ciliares (CONE, 2009).

Figura 2: Os tipos celulares da camada epitelial da mucosa nasal. A: células epiteliais ciliado; B: células epiteliais não ciliado; C: células de goblet; E: Camada de muco; D: Camada de sol; F: Células Basais; G: Membrana basal. (UGWOKE et al. 2005).

O muco é secretado principalmente pelas células de goblet, é composto predominantemente de glicoproteínas, denominadas mucinas, as quais são secretadas na superfície do epitélio e outras que se mantêm associadas à membrana das células epiteliais (VOYNOW; RUBIN, 2009).

O muco juntamente com outras secreções, como peptídeos antimicrobianos, tem com função proteger a superfície do tecido, contra a adesão, proliferação, invasão de patógenos e prevenir o acúmulo de substâncias externas e endógenas em seu epitélio (EVANS; KOO, 2009; OOI *et al.*, 2010). Além dessas substâncias, agentes celulares como células dendríticas e macrófagos, auxiliam nessas funções, por digestão dos antígenos externos via fagocitose ou pinocitose (STORNI *et al.*, 2005).

Devido às propriedades das mucosas, nasal, oral, gástrica e entre outras de responder imunologicamente aos antígenos, possibilitou-se outras abordagens na aplicação de vacinas (AMIN *et al.*, 2009; KANG, M. L. *et al.*, 2009).

Dentre as mucosas, a nasal é alvo de pesquisas, como local de entrega de antígenos, pois essa via apresenta: significativa área superficial disponível para absorção dos antígenos (ALHALAWEH *et al.*, 2009); alta vascularização do epitélio (ZHANG, et al., 2008); presença de tecido linfóide nasal (NALT) (BRANDTZAEG,

2010); e alta resposta imunológica (AMIN *et al.*, 2009), que poderia acarretar, aplicações de doses menores (KANG, M. L. *et al.*, 2009), consequentemente diminuir a probabilidade de uma reação inflamatória.

A imunização via nasal, porém, apresenta algumas limitações como a absorção de antígeno, devido à defesa fisiológica não específica da mucosa, que renova o muco pela sua secreção e pela movimentação ciliar das células epiteliais, que por sua vez deslocariam os antígenos para fora do seu local de interesse, resultando uma baixa disponibilidade da proteína a ser absorvida (ARORA *et al.*, 2002; KANG, M. L. *et al.*, 2009).

Outra limitação, é que a mucosa tende a entrar em tolerância, ou seja, a suprimir a resposta contra antígenos a quais são expostos, que poderia ser um problema para a imunização por via intranasal (BERG, VAN DEN *et al.*, 2010).

Porém esses problemas podem ser contornados pela adição de inibidores da movimentação ciliar e/ou pela utilização de quitosana modificada fisicamente, como citado anteriormente, ou pela utilização de derivados de quitosana e quitosana associada a diferentes sais, com o objetivo de aumentar a muco- adesividade à mucosa (HENNING *et al.*, 2010; VASIR *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2004).

1.3. Sistema imune da mucosa

A resposta imune da mucosa tem como objetivo final a excreção de IgA pelo seu epitélio (BRANDTZAEG, 2010).

A IgA secretada tem como função proteger os indivíduos dos antígenos na mucosa, (MESTECKY; RUSSELL, 2009), a proteção é conferida ao indivíduo por mecanismos: de exclusão que compreende na incapacidade de adesão dos antígenos ou patógenos ao epitélio pela reação antígeno – anticorpo, e por secreção, no qual

os antígenos que por ventura ultrapassam o epitélio, são capturados pelas IgAs e conduzidas para o lúmen via receptores de Ig (pIgR) (BRANDTZAEG, 2007).

As mucosas conseguem realizar uma resposta imune devido ao MALT (*mucosal-associated lymphonoid tissue*), o qual compreende em NALT (*nasopharynx-associated lymphonoid tissue*), presente na mucosa nasal, BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*), presente principalmente na mucosa bronquiolar (BRANDTZAEG, 2010). No tecido linfoide nasal estão presentes todas as células imunocompetentes necessárias para a resposta imune da mucosa (figura 3) como: células células M (*microfold cell*); linfócitos B e T; e células dendríticas (KIYONO, HIROSHI; FUKUYAMA, 2004).

As células M apresentam em sua superfície micro - dobras, e estão localizadas na superfície da mucosa, apesar de não são secretarem muco e enzimas digestivas, essas são responsáveis pelo transporte de substâncias presentes no lúmen para as concavidades, presentes nas células basolateralmente, onde encontram-se as células dendríticas, macrófagos e linfócitos (TAKAHASHI *et al.*, 2009; YUKI, Y.; KIYONO, H., 2003).

Figura 3: Resposta imune da mucosa nasal. Ao interagir com os antígenos disponibilizado pela células M, o macrófago e célula dendrítica migram para o NALT e para o Anel de Waldeyer, um conjunto de linfonodos, provocam a resposta imune, induzindo a diferenciação das células B em plasmócitos secretores de IgA. Figura obtida e modificada de Amidi et al.(2010).

Os linfócitos T são responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, e ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, sendo esses responsáveis pela produção de anticorpos como IgG, IgA, a qual será liberada na superfície da mucosa (FUJIHASHI; MCGHEE, 2005; LEFRANÇOIS, 2005).

No processo de reposta imune da mucosa, a interação do antígeno com as células dendríticas provoca a produção e liberação de citocinas IL-4, IL-10 e IL-12, NO (óxido nítrico), TNF (*Tumor necrosis factor*), sua migração adentro do NALT e do anel de Waldeyer (conjunto de tecidos linfóides como a amígdala e adenóides). Essas citocinas provocam a maturação dos linfócitos T, de T CD4⁺ Th0 em Th1 (devido ao IL-10 e IL-4) e Th2 (devido ao IL-12). As células Th1 produzem as citocinas IL-2, TNF- β e INF- γ (*interferon* – γ) e as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 sendo que o INF- γ inibe a proliferação das células Th2 e B, porém a

produção dessas citocinas é inibida pela presença de IL-10 (FUJIHASHI; MCGHEE, 2005; KELSALL *et al.*, 2005; LEFRANÇOIS, 2005).

As citocinas produzidas por Th2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 afetam os linfócitos B, promovendo o *class-switching* nas imunoglobulinas de sua superfície de SIgM em SIgA, induzindo sua proliferação e diferenciação desses linfócitos B em células plasmáticas secretoras de IgA, a qual é secretada quando essas células encontram o seu sítio de liberação na mucosa (FUJIHASHI; MCGHEE, 2005; LEFRANÇOIS, 2005).

A mudança de classe das imunoglobulinas de superfície e diferenciação dos linfócitos B pode ser promovida independente células T, pois células dendríticas, ao capturarem antígenos diretamente do lúmen da mucosa, podem interagir com os linfócitos B, provocando a liberação de citocinas BAFF, APRIL e NO, responsáveis pelo *class-switching* das células B e diferenciação dessas em células secretoras de IgA (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

2. Justificativa

A vacinação via mucosa nasal utilizando nanopartículas apresenta uma boa alternativa aos métodos convencionais de vacinação, pois a aplicação utilizando nanopartículas dispensa o uso de agulhas, e a mucosa nasal é capaz de oferecer proteção sistêmica e às mucosas.

A mucosa nasal apresentar uma grande área superficial disponível para a absorção do antígeno, essa também apresenta células imunocompetentes em toda sua extensão, capazes de processar o antígeno e desencadear uma resposta imune sistêmica e da mucosa nasal contra esse antígeno.

Com o advento da nanotecnologia, é possível estruturar uma nanopartícula, utilizando-se um polímero biodegradável e atóxico como a quitosana, capaz de carrear e disponibilizar antígenos, associados à nanopartícula, à mucosa nasal, devido à propriedade muco – adesiva à mucosa nasal da nanopartícula.

Contudo, serão necessários estudos para elucidar sobre o comportamento da quitosana formulada em nanopartículas, sobre a resposta imune sistêmica e da mucosa contra o antígeno de superfície da hepatite B.

3. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial imunológico das nanopartículas de quitosana utilizadas como veículo de entrega de antígenos à mucosa nasal.

O objetivo principal foi a verificar, a resposta de IgG sérica contra HBsAg, e a secreção de sIgA total dos lavados das cavidades nasais de camundongos imunizados com as nanopartículas e se a imunização intranasal levaria a tolerância.

Como objetivo secundário, estudar as modulações da resposta imunológica, e a influência da liberação de citocinas, tais como: IL-1 β , IL-6, IL-10 pelas células RAW 264.7 e o balanço de IgG1/ IgG2a séricos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Nanopartículas de quitosana

4.1.1. Preparação e carregamento

Para a preparação da nanopartícula de quitosana utilizou-se quitosana de baixo peso molecular, com grau de desacetilação de 75-85% (Sigma-Aldrich), ácido acético glacial (Synth); e tri-polifosfato de sódio 85% (TPP) (Sigma-Aldrich).

A formação da nanopartícula foi realizada utilizando o método de geleificação iônica, o qual é baseado na interação eletrostática entre os agrupamentos amina da quitosana com os agrupamentos negativos de outra substância como o TPP (CSA-BA; KÖPING-HÖGGÅRD; ALONSO, 2009).

Para a formação das nanopartículas, duas soluções distintas foram utilizadas, a primeira, contendo quitosana, diluída em uma solução de ácido acético à 1% em água (volume/volume), à 2 mg/ml. A solução de ácido acético foi previamente alcalinizada com a utilização de uma solução de NaOH, para obter uma solução de pH 5.

A segunda é composta por uma solução de TPP à uma concentração de 1 mg/ml, na qual será adicionado o antígeno à para a concentração final de 0,160 mg/ml.

O processo de geleificação iônica ocorre a partir da adição de 10 ml da solução de TPP, por gotejamento, em 15 ml da solução de quitosana, o qual estará em agitação magnética, devido ao baixo volume a agitação foi da suspensão começou em 450 RPM até 750 RPM, a velocidade foi aumentada gradualmente ao decorrer da adição da solução de TPP.

O processo de gotejamento ocorreu durante, aproximadamente, 10 minutos e todo o processo ocorre em temperatura ambiente.

Para observar o carregamento de antígeno pelas partículas, foi utilizado como modelo, a albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich), devido ao seu baixo custo e fácil disponibilidade em relação ao HBsAg.

O carregamento da albumina à nanopartícula ocorreu com a adição de 0,160 mg de albumina para cada mililitro da solução de TPP, anteriormente a adição dessa com a solução de quitosana, com o objetivo de se incorporar o antígeno no interior da nanopartícula.

Após mistura das soluções, a suspensão é mantida em agitação durante 60 minutos e depois centrifugada em microtubos contendo 10 uL de glicerol, depositado no fundo do tubo sem sua diluição, por 30 minutos à 13000g. Posteriormente o sobrenadante é guardado para posterior análise de teor proteico, e o corpo de fundo é suspenso em solução de NaCl 0,15M.

No experimento utilizando o HBsAg o volume do experimento foi reduzido para 3 ml de solução de quitosana para 2 ml de solução de TPP, no qual foi adicionado o HBsAg para a concentração final de 0,135 mg/ml. Nesse experimento foi adicionado NaCl para a concentração final de 0,15M para as soluções de quitosana e TPP.

O antígeno HBsAg foi obtido via de doação proveniente do Instituto BUTANTAN (Serv. Virol. Nº 056/11) recebido dia 22 de julho de 2011, e para o carregamento desses à nanopartícula foi adicionado 0,135 mg de HBsAg por mililitro da solução de TPP.

4.1.2. Caracterização

As características das nanopartículas como tamanho e índice de polidispersão (IDP), que define a uniformidade de tamanho das partículas presentes em uma suspensão, foram determinados por espectrometria de correlação de fótons, utilizando-se do aparelho *N4 Plus Submicron Particle Size Analyzer* (Beckman Coulter). A morfologia da suspensão de nanopartículas foi observada por microscopia eletrônica de varredura.

A taxa de associação do antígeno à nanopartícula foi calculada pela razão da diferença entre as massas de antígeno aplicado no começo do experimento e de antígeno presente no sobrenadante, proveniente da centrifugação das suspensões, pela massa total presente na suspensão e multiplicada por cem para obter a taxa em porcentagem.

Antes de utilizar as suspensões de nanopartículas associadas com HBsAg, foi realizado uma dosagem proteica. A taxa de associação foi levado em consideração no cálculo de diluição das nanopartículas centrifugadas, para o volume que foi aplicado nos animais.

A quantificação dos antígenos foi determinada pelo teste de proteína BCA com a absorbância mensurada em 562 nm.

4.2. Imunização

Na imunização, foram utilizados 30 camundongos BALB/c do sexo masculino de 4 semanas de idade, proveniente do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, projeto aprovado pela Comissão De Ética No Uso De Animais no dia 04 de junho de 2011, protocolo CEUA/FCF/327.

Os animais são divididos em grupos:

- QH – grupo de 6 animais que receberam as nanopartículas de quitosana conjugada com o antígeno HBsAg;
- Q – grupo de 6 animais que receberam somente as nanopartículas de quitosana;
- H – grupo de 6 animais que receberam somente o antígeno HBsAg;
- CP – grupo de 6 animais que receberam o antígeno HBsAg somente por via intraperitoneal;

- CN – grupo de 6 animais que receberam somente tampão fosfato pH 7,4, como controle negativo

Os grupos QH, Q, H e CN, receberam duas imunizações por via nasal e uma inoculação intraperitoneal com intervalo de 2 semanas entre as imunizações (Tabela 1).

Nas imunizações via nasal, foram administradas 10 µl de suspensão (contendo 10 µg de antígeno), 5 µl em cada narina com uma pipeta de 10 µl. Nas inoculações intraperitoneal foram aplicados 100 µl de HBsAg à 100µg/ml.

No dia 28 todos os grupos, com exceção dos grupos DC e CN, foram inoculados com o antígeno por via intraperitoneal.

Durante as imunizações por via nasal, os animais foram sedados e permaneceram em posição supina e durante 1 minuto após a aplicação.

Tabela 1 – Cronograma de Imunização e Coleta.

Dia	0	7	14	21	28	35
Inoculação	x		x		x	
Coleta (sangue)		x		x		x
Coleta (muco nasal)						x

4.3. Coleta

As coletas de sangue, para a obtenção do soro, e a secreção nasal, ocorreram de acordo com o quadro apresentado acima (Tabela 1).

4.3.1. Soro

A obtenção do soro ocorreu pela coleta de sangue plexo mandibular e via pulsação cardíaca ao final do experimento. Após a obtenção do soro, este foi armazenado em freezer para posterior análise de IgG, IgG1 e IgG2a pelo método colorimétrico de Elisa (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*).

4.3.2. Secreção nasal

A secreção nasal foi coletada pela lavagem da cavidade nasal com solução de 200 µl de albumina sérica bovina (BSA – *bovine serum albumin*) a 1% em PBS com 0,1% de inibidores de protease, a qual foi forçada a passar da traqueia até as narinas do animal, submetidos, previamente, a eutanásia por dióxido de carbono. Posteriormente o lavado foi centrifugado em 6000 g por 15 minutos e a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado em freezer para posterior análise de IgA por Elisa.

4.4. Elisa (*Enzyme-linked-immunosorbent-assay*)

Para o teste imunoenzimático de IgG, 100 µl de antígeno (Hepatite B) previamente dissolvido no tampão carbonato-bicarbonato 0,05M de pH 9,6 a uma concentração de 1 µg/100 µl são adicionados às cavidades da micro-placa a qual será incubada a 4 °C *overnight*. Após, a micro-placa é lavada com PBS-Tween (PBS com 0,05% de Tween 20) para remover os antígenos que não se aderiram à placa e em seguida, cada cavidade é preenchida com 100 µl de BSA à 5 mg/ml incubadas à temperatura ambiente por 1 hora para bloquear os espaços na placa na qual não foram aderidos pelos antígenos. Depois disso, a placa é lavada com PBS-Tween (PBS com 0,05% de Tween 20). Em seguida, 100 µl das soluções das amostras contendo IgG do soro foram diluídas em PBS-Tween com 2 mg/ml de BSA e então adicionados à cada cavidade da placa, a qual é incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após, a placa é lavada novamente com PBS-Tween.

Para a adição de anticorpos, foram adicionados 100 µl em cada poço de uma solução de 1:5000 de anticorpos anti-anticorpo conjugado com peroxidase diluídos

em uma solução de BSA à 2 mg/ml. Após é incubada à temperatura ambiente por 1 hora e em seguida lavada com PBS – Tween.

Depois das lavagens, 100 µl da solução de substrato, constituído de 50 mg de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) diluídos em 100 ml de tampão citrato-fosfato 0,18M de pH 4.0 e adicionado à 30 µl de peróxido de hidrogênio 30%, são então adicionados a cada cavidade e em seguida, a micro- placa será deixada no escuro à temperatura ambiente para o surgimento da cor. A reação é finalizada através da adição de 50 µl de solução de H₂SO₄ 2,5M em cada cavidade. Por fim, a placa será lida no leitor de ELISA a 492 nm.

Nos testes de elisa para IgA dos lavados nasais, a sensibilização das placas foram realizadas com a aplicação de anti- IgA de camundongo na concentração de 1 µg/100 µl de tampão carbonato por poço. Foram aplicados 100 µl de lavados nasais em cada poço em uma diluição de 1:2 em PBS- Tween com 2 mg/ml de BSA e incubados por 2 horas. Após, 100 µl de uma solução de anticorpos anti-IgA conjugado com peroxidase, diluídos na proporção de 1:5000 em PBS-Tween com 2 mg/ml de PBS, foram adicionados em cada poço e em seguida incubados durante 1 hora.

Nos testes de elisa para IgG1 e IgG2a, foram feitos os mesmos procedimentos do teste de elisa, porém se adicionou um procedimento a mais no qual foram aplicados 100 µl de anticorpos anti- IgG1 e anti-IgG2a (separadamente, sendo um p/ cada teste) na diluição de 1/5000 em PBS-Tween com 2mg/ml em cada poço e incubado por 1 hora. Depois das lavagens, 100 µl de uma solução de anticorpos anti-IgG conjugado com peroxidase, diluídos na proporção de 1:5000 em PBS-Tween com 2 mg/ml de PBS, foram adicionados em cada poço e em seguida incubados durante 1 hora.

As etapas de revelação e lavagens decorreram de acordo com os procedimentos do elisa para IgG.

Os procedimentos para os testes de elisa para as citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10 IL-1β, foram realizados de acordo com as instruções contidas no kit de elisa (*Mouse*

ELISA Ready-SET-Go! da Ebioscience), com aplicação das amostras na proporção de 1:2.

4.5. Teste *in vitro* com células RAW 264.7

As células da linhagem RAW 264.7, foram descongeladas e expandidas em garrafas de cultura, utilizando como meio de cultura, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DEMEN) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10 % (volume/volume) de soro fetal bovino (Cult-Lab). A expansão ocorreu até a obtenção da quantidade de células necessárias para os experimentos.

Os experimentos foram realizados em placas de culturas de 24 poços, nos quais foram semeados $2 \cdot 10^5$ células por mililitro por poço e após um dia, esses poços foram submetidos aos mesmos tratamentos de antígenos dos grupos QH; Q e H, durante 24 horas, como controle positivo foi utilizado lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µg/ml. Após esse período os sobrenadantes foram coletados para os testes de óxido nítrico e de elisa para as citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10 IL-1β.

4.5.1. Teste de óxido nítrico

O óxido nítrico é liberado pelos macrófagos em resposta a interações com lipopolissacarídeos de origem bacteriana e também pela interação com outras citocinas, da resposta imunológica.

O teste de óxido nítrico foi realizado pela coleta de 50 µl de sobrenadante das culturas celulares, e em seguida, depositados em uma placa de microtitulação de 96 poços, na foi adicionada 50 µl de uma solução de sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5% e incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois foi adicionado 50 µl de reagente de Griess (Sigma-Aldrich) e incubado novamente durante 10 minutos

em temperatura ambiente. Após a incubação foi realizado a leitura da placa em 550 nm.

4.6. Métodos Estatísticos

As análises tais como concentração de antígenos não associados na formação da nanopartícula foi realizada em triplicata.

As análises das respostas de IgA e IgG das coletas de lavado nasal e do soro, foram realizadas em triplicata, e analisados por análise de variância com $\alpha = 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Nanopartícula de Quitosana

A preparação de nanopartículas de quitosana utilizado- se do processo de geificação iônica resultou na formação de nanopartículas demonstrados pelas tabelas a seguir.

Os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, demonstraram os tamanhos de partículas e índice de polidispersão que foi obtido nos experimentos utilizando soluções de quitosana e de TPP com pH 5,03 e 9,62, respectivamente, para os experimentos, I, II, III da tabela 1 e pH igual para a solução de quitosana, e pH 7,03 para o TPP, nos experimentos exibidos na tabela 2.

As partículas dos experimentos da tabela 3 apresentaram média de 401,9 nm, com coeficiente de variação de 15,98%, e IPD de 0,595, um índice considerado alto. Com relação as nanopartículas produzidas nos experimentos da tabela 2, o tamanho médio foi de 184,5 nm com 1,97% de variação e com IPD com aproximadamente metade do valor (0,294) apresentado pelos experimentos citados acima.

Os valores obtidos na tabela 2 foram semelhantes aos obtidos por Dudhani e Josaraju (2010), no qual foi obtido nanopartículas de aproximadamente 200 nm utilizando parâmetro semelhantes de pH da quitosana e TPP, porém com relação de massa entre eles de 2,5:1 (quitosana:TPP), porém apresentaram IPD de 0,570.

Como o único parâmetro variável entre os testes foi o pH da solução de TPP, observou- se a significativa influência do pH na formulação da nanopartícula, observada também por ALI *et al.* (2010) e NASTI *et al.* (2009).

Tabela 2 – Tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) de partículas do experimento utilizando soluções de quitosana a 2 mg/ml pH 5,03 e TPP 1 mg/ml pH 9,62.

Experimentos	Tamanho Médio (nm)	Desvio (nm)	IPD
1º	187,8	5,01	0,174
2º	185,1	1,97	0,306
3º	180,6	1,7	0,402
Média	184,5	2,89	0,294
Desvio Padrão	3,63	1,83	0,11
Coeficiente de Variação (%)	1,97	63,52	38,93

Tabela 3 – Tamanho médio e índice de polidispersão (IPD) de partículas do experimento utilizando soluções de quitosana a 2 mg/ml pH 5,03 e TPP 1 mg/ml pH 7,03.

Experimentos	Tamanho Médio (nm)	Desvio (nm)	IPD
1º	318,6	5,93	0,48
2º	384	8,81	0,57
3º	453,7	11,24	0,7
4º	451,3	14,75	0,63

Média	401,9	10,18	0,595
Desvio Padrão	64,24	3,73	0,093
Coeficiente de Variação (%)	15,98	36,72	15,67

A tabela 4, apresenta a taxa de associação da albumina sérica bovina, obtido pela quantificação proteica do sobrenadante após a centrifugação das suspensões do experimento utilizando a solução de quitosana pH 5,03 e TPP pH 7,03 no qual foi adicionado o BSA.

Tabela 4 – Taxa de associação de albumina com a nanopartícula de quitosana obtido da reação de geleificação iônica utilizando quitosana 2 mg/ml pH 5,03 e TPP 1 mg/m pH 7,03, no qual foi adicionado 1,6 mg de albumina bovina.

Sobrenadante	Albumina Inicial (µg)	Albumina no Sobrenadante (µg)	Taxa de associação (%)
I	1600	137,81	91,38
II	1600	134,16	91,62
III	1600	124,52	92,22
IV	1600	180,01	88,75

5.1.1. Nanopartícula de quitosana com HBsAg

Os tamanhos de nanopartículas obtidas com a adição do antígeno HBsAg está descrito nas tabelas abaixo.

Nesse experimento foi adicionado NaCl nas soluções de quitosana e TPP à concentração de 0,15M, que de acordo com Huang e Lapitsky (2011), isso ajuda na formação de suspensões mais homogêneas, pela inibição de agreamento das partículas provocados pela ação do TPP livres no meio.

O resultado mostrado na tabela 5, demonstra a adição do sal monovalente às soluções ajudou a diminuir o índice de polidispersão e o tamanho médio das partículas em suspensão, mesmo utilizando o TPP com pH 7,74, o qual influenciou negativamente o experimento da tabela 3.

Tabela 5 – Tamanho e índice de polidispersão (IPD) das nanopartículas de quitosana obtidas pela geleificação iônica da solução de quitosana 2 mg/ml pH 5,0 com a solução de TPP 1 mg/ml pH 7,74, nas duas soluções foram adicionados anteriormente NaCl para a concentração final de 0,15M.

Experimentos	Tamanho Médio (nm)	Desvio (nm)	IPD
1º	264,9	91,1	0,4
2º	280	103,2	0,155
3º	273,6	95,8	0,28
4º	287,7	100,7	0,254
Média	276,55	97,7	0,272
Desvio Padrão	9,67	5,37	0,10

Coefficiente de Variação (%)	3,50	5,49	37,01
---------------------------------	------	------	-------

Apesar do processo utilizando a solução de TPP em pH 9,62 (tabela 2) obter resultados semelhantes ao processo acima, este apresenta pH mais neutro e brando para o antígeno.

Assim realizou o mesmo procedimento, utilizando-se o antígeno HBsAg, no qual resultou na formação de partículas com diâmetro médio de 248,4 nm, com desvio de 80,9 nm e índice de polidispersão de 0,286.

O tamanho das nanopartículas ficaram semelhantes à nanopartículas obtidas por Liu e Gao (2009), com tamanhos de 250 à 300 nm utilizando parâmetros semelhantes como pH e concentração da solução de quitosana, concentração de TPP e pH da suspensão final.

Kim e Kang (2008) obtiveram partículas associados ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B, entre 200 a 400 nm, o tamanho foi modulado pela mudança do pH do experimento entre 3,5 à 5,5, e pela concentração de antígenos.

Prego e colaboradores (2010), conseguiram taxas de a associação de HBsAg, de aproximadamente 62%, em partículas de 200 nm, porém a taxa de associação obtida neste trabalho foi baixa em comparação com o trabalho de Mangal e colaboradores (2011), no qual conseguiu-se quase 90% de taxa de associação, em nanopartículas de 210 nm.

A diferença na taxa pode estar relacionada a diferença do peso molecular da quitosana utilizadas nos experimentos e pH das soluções (ALI *et al.*, 2010), pela concentração de da quitosana e antígenos utilizados no método de geleificação iônica e grau de acetilação da quitosana (LUO *et al.*, 2010; XU, Y.; DU, YUMIN, 2003), pois dependendo da concentração do antígeno, por exemplo, pode ser que haja a saturação dos agrupamentos amina da quitosana pelos antígenos e impossibilitando

a associação de mais antígenos. A disparidade pode ser ocasionada pela concorrência de sítio de ligação das proteínas pelo TPP, devido sua alta densidade energética que se ligam aos agrupamentos amina e diminuem a quantidade de sítios de ligações para as proteínas (JANES; ALONSO, M. J, 2003)

Janes e Alonso (2003) observaram a diminuição na taxa de associação devido à mudança da proteína utilizada para ser encapsulada, como o ocorrido neste trabalho (tabela 4 e 6), nas quais a taxa de associação diminuiu de aproximadamente 90 % (albumina sérica bovina) para 50- 60% (HBsAg). No trabalho de Janes e Alonso foi sugerido que diferença ocorreu devido a diferenças no peso molecular das proteínas utilizadas.

Tabela 6 – Taxa de associação de HBsAg com a nanopartícula de quitosana utilizados na 1ª e 2ª imunização obtidos da reação de geleificação iônica utilizando quitosana 2 mg/ml pH 5,03 e TPP 1 mg/ml pH 7,03, no qual foi adicionado 270 µg de HBsAg anteriormente a reação.

	HBsAg Inicial (µg)	HBsAg no sobrenadante (µg)	Taxa de associação (%)
1ª Imunização	270	134,52	50,18
2ª Imunização	270	109,42	59,47

5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura

As fotos abaixo são fotografias tiradas por microscopia eletrônica de varredura, sendo a foto 1, da suspensão sem o antígeno e a foto 2, com o antígeno.

Observou-se que as suspensões agregaram-se formando um material de aparência porosa. Este aspecto foi causado a alta concentração de nanopartículas apli-

çadas e pelo processo de secagem utilizados na microscopia. As nanopartículas podem ser identificadas pelos glomérulos entre os espaços vazios.

Foto 1. Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de nanopartículas sem HBsAg.

Foto 2. Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de nanopartículas com HBsAg.

5.2. Teste de Elisa de IgG sério

Foi realizado o teste imuno-enzimático para avaliar a resposta de anticorpos IgG específicos contra o antígeno HBsAg.

A produção de IgG na primeira sangria dos camundongos (no 7º dia) não produziu IgG suficiente para ser detectada pelo teste de elisa, contudo as repostas de IgG da segunda e terceira sangria são demonstradas nos gráficos abaixo.

As respostas de anticorpos do grupo CN, não foram plotados nos gráficos, pois esses foram utilizados para a padronização do teste de elisa.

Gráfico 1 - Resposta de IgG contra HBsAg na 2ª sangria dos grupos QH; Q; H e CN, depois de 7 dias após a 2ª imunização.

O primeiro gráfico mostra o grupo H como o de maior resposta, porém esse não apresenta diferença estatística em relação ao grupo QH, tal como, entre os grupos Q e CN ($p < 0,05$). Em relação aos grupos QH e Q houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Observou-se a alta variabilidade da resposta de anticorpo do grupo QH, apesar da utilização de camundongos isogênicos, isso é decorrente da variação da resposta imune de cada camundongo, influenciados pela diferença na captura das nanopartículas pela mucosa nasal de cada animal, o qual é afetado também pela anestesia do animal no momento da inoculação do antígeno.

Gráfico 2 – Resposta de IgG contra HBsAg na 3ª sangria dos animais dos grupos QH; Q; H; CP e CN, após a imunização intraperitoneal de todos os grupos com 10 µg de HBsAg.

No gráfico 2, o grupo QH demonstrou maior resposta de IgG em relação aos outros grupos, sendo significativamente diferente desses grupos ($p < 0,05$).

Mangal e colaboradores (2011), realizaram a imunização intranasal de nanopartículas de quitosana associado à HBsAg, nos dados apresentados foi possível observar a que os animais imunizados com nanopartículas de quitosana apresentaram títulos de anticorpos significativamente maiores comparados com o grupo que foi imunizado, somente com HBsAg, a partir do 26º dia, tal como foi apresentado nesse trabalho.

Prego e colaboradores (2010), realizaram a imunização intramuscular e intranasal, e demonstraram que a imunização intranasal conseguiu estimular a resposta de IgG sérico suficientes para conferir proteção à hepatite B.

A mucosa nasal pode entrar em mecanismo de tolerância pela inibição das células T CD8⁺, células T CD4⁺; pela proliferação das células T reguladoras, quando esses são estimulados com antígenos (BERG, VAN DEN *et al.*, 2010). Porém, a repos-

ta de anticorpos contra o antígeno demonstrou que o sistema imune não entrou tolerância contra o HBsAg.

O aumento da resposta de anticorpo do grupo QH em relação ao H, isso pode ter ocorrido pelo processamento das nanopartículas, em relação à captura, fagocitose, e processamento e apresentação dos antígenos presentes nas partículas, os quais podem ter sido liberados lentamente.

5.3.3. Teste de Elisa para IgG1 e IgG2a.

Os níveis de anticorpos IgG2a e IgG1 foram analisados dos soros obtidos na última sangria, para determinar o tipo de resposta que os tratamentos estavam estimulando.

Tabela 7. Relação de títulos de IgG1 e IgG2a.

Grupos	Relação IgG2a/IgG1
QH	0,877
H	0,641
CP	0,350

Gráfico 3 – Relação das respostas de anticorpos IgG1 e IgG2a dos grupos QH; H e CP, após a 3ª sangria.

Os resultados demonstraram uma tendência de resposta tipo Th2, para os grupos H e CP devido a maior nível de IgG1 em relação a IgG2a ($p < 0,05$), porém os títulos do grupo QH não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), os quais podem ter sido causadas pela última imunização realizada via intraperitonealmente, que pode estimular a resposta tipo Th1.

Nos trabalhos de Tafaghodi e colaboradores (2012) e Mangal e colaboradores (2011), foram observadas as mesmas tendências observadas nos grupos QH, H e CP, nos quais grupos imunizados com HBsAg com ou sem quitosana apresentaram o título de IgG1 maior que o de IgG2a, tal como o grupo controle (imunização parenteral somente de HBsAg).

Outros autores obtiveram resultados parecidos, na utilização de nanopartículas de quitosana associada com alginato para entrega do HBsAg por via subcutânea (BORGES *et al.*, 2008).

Porém essa tendência para a resposta do tipo Th2 não foi observado no trabalho de Jan e colaboradores (2011), no qual o HBsAg administrado *in-vitro* induz a produção de citocinas pró Th1.

Wen e colaboradores (2011), concluíram que as nanopartículas de quitosana conseguem estimular, tanto a resposta tipo Th1, como a resposta Th2.

Slütter *et al.*(2010), observou um alto direcionamento para a resposta Th2, após a imunização realizada utilizando nanopartículas de quitosana modificadas pela metilação de sua cadeia polimérica.

5.2. Teste de Elisa de IgA

Foi realizado o teste imuno-enzimático para avaliar a resposta de anticorpos IgA total.

Gráfico 4 – Resposta de IgA secretado total presentes nas secreções nasais dos grupos QH; Q; H; CM e CP, coletados durante a 3ª sangria.

No gráfico 4, as nanopartículas de quitosana associadas com ou sem o HBsAg, e somente HBsAg estimularam a secreção maior de IgA total pela mucosa em relação ao grupo CP e CN, demonstrando que além da estimulação da secreção de IgG, a quitosana junto com o HBsAg também é capaz de estimular a resposta imune da mucosa.

Os resultados apresentados neste trabalho também foram obtidos por Illum (2001), no qual a concentração de IgA apresenta diferenças significativamente maiores que as repostas de IgA do grupo imunizado com o antígeno associado ao hidróxido de alumínio.

Vila e colaboradores (2004), também obtiveram respostas de IgA e IgG maiores em grupos que foram imunizados com nanopartículas de quitosana associados ao antígeno modelo por via nasal, comparados com grupos no qual somente o antígeno foi inoculado por via nasal.

5.3. Testes *in-vitro*

5.3.1. Teste de óxido nítrico

As respostas de óxido nítrico dos grupos QH, Q, H e do controle negativo não apresentaram níveis detectáveis ($<1,56 \mu\text{M}$) de óxido nítrico, porém no controle positivo, o LPS estimulou a liberação de $3,92 \mu\text{M}$ de óxido nítrico.

5.3.2. Teste de elisa para TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10

As respostas de TNF- α estão apresentadas no gráfico 5.

Gráfico 5 - Resposta de TNF- secretado pela cultura de células RAW 264.7 sensibilizados com nanopartículas de quitosana associados com a proteína de superfície do vírus da hepatite B (grupo QH; somente nanopartículas de quitosana (grupo Q); somente HBsAg (gtupo H); somente LPS e CN como grupo de controle negativo.

As respostas de TNF- α , dos grupos QH, Q e LPS não apresentaram diferenças significativas, tal como a resposta do grupo H com o controle negativo, mas os grupos QH, Q e LPS são significativamente maiores que o controle negativo e o grupo H. Esse gráfico demonstra que a quitosana está induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, pois os grupos tratados com, somente quitosana, obtiveram níveis semelhantes de TNF- α .

Os níveis de IL-6, IL-1 β e IL-10 presentes no sobrenadante das células do teste *in-vitro* dos grupos QH; Q; H e CN ficaram abaixo do nível detectável (<4 pg/ml), porém no grupo LPS houve a liberação de 275,82 pg/ml de IL- 6, porém não apresentou níveis detectáveis para as outras citocinas.

No trabalho de Villiers e colaboradores (2009), a quitosana não estimulou a secreção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10, em culturas de células dendríticas.

Yoon e colaboradores (2007) sugerem que a quitosana tem um efeito anti-inflamatório inibindo a produção de óxido nítrico e IL-6 via estímulo de TNF- α nas células RAW 264.7. Além da inibição secreção dessas citocinas, a secreção de IL-1 β também é inibida pela quitosana (QIAO *et al.*, 2010), o que poderia explicar a baixa resposta de IL-6, IL-1 β . A inibição da produção de óxido nítrico também foi observada por Hwang e colaboradores (2000)

Apesar do efeito inibitório da quitosana sobre o TNF- α , descrito em literatura, a atividade inibitória/estimulatória da quitosana depende do estado em que as células alvo estão ativadas ou não por algum componente como o LPS, no caso descrito acima. No caso das células RAW 264.7 não estimuladas, a quitosana promove a liberação de mediadores pró-inflamatória (PORPORATTO *et al.*, 2005 apud HWANG *et al.*, 2000).

O efeito estimulador da quitosana pode estar relacionado com a ligação da cadeia de N- acetil- D- glucosamina com os receptores de manose dos macrófagos que estimulam a produção de TNF- α ao fagocitarem as partículas de quitosana (SHIBATA *et al.*, 1997).

6. Conclusão

As nanopartículas de quitosana associadas ao HbsAg e imunizados por via intranasal conseguiram estimular o sistema imune, este obteve respostas de IgG sérico, sugerindo que o antígeno foi entregue às células imunocompetentes.

Além de entregar o antígeno, as nanopartículas não estimularam a mucosa para uma resposta de tolerância, pois após a imunização intraperitoneal, houve um efeito estimulante da resposta imune que apresentou o aumento de IgG sérico.

As nanopartículas conseguiram estimular a secreção de IgA pela mucosa nasal, devido a maior concentração de IgA obtidos dos lavados nasais em relação ao grupos controles.

As citocinas testadas dos sobrenadantes da cultura celular mostram que a quitosana sozinha provoca a secreção de TNF- α , o que pode sugerir um efeito adjuvante necessário para a ativação da resposta imune.

O balanço de IgG2 e IgG1a , sugerem que a formulação testada nesse trabalho apresentou uma resposta balanceada, com tendência a resposta tipo Th2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHALAWEH, A.; ANDERSSON, S.; VELAGA, S. P. Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 206-214, 8 out 2009.

ALI, S. W.; JOSHI, M.; RAJENDRAN, S. Modulation of Size, Shape and Surface Charge of Chitosan Nanoparticles with Reference to Antimicrobial Activity. **Advanced Science Letters**, v. 3, n. 4, p. 452-460, 2010.

AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59-82, 31 jan 2010.

AMIN, M.; JAAFARI, M. R.; TAFAGHODI, M. Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 74, n. 1, p. 225-229, 1 nov 2009.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, mar 2009.

ARORA, P.; SHARMA, S.; GARG, S. Permeability issues in nasal drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 18, p. 967-975, 15 set 2002.

BARROS, F. C. F.; CAVALCANTE, R. M.; CARVALHO, T. V.; DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 7, n. 4, p. 232-246, 2006.

BERG, H. VAN DEN; GREUTER, M.; KRAAL, G.; HAAN, J. M. M. DEN. Different mechanisms regulate CD4+ T cell independent induction of oral and nasal tolerance of CD8+ T cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 2, p. 163-171, fev 2010.

BORGES, O.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; TAVARES, J. *et al.* Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate coated chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 405-416, jun 2008.

BORGES, O.; LEBRE, F.; BENTO, D.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. Mucosal Vaccines: Recent Progress in Understanding the Natural Barriers. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 2, p. 211-223, 1 fev 2010.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 26 jul 2007.

BRANDTZAEG, P. Function of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue in Antibody Formation. **Immunological Investigations**, v. 39, n. 4-5, p. 303-355, 2010.

CANO-CEBRIÁN, M. J.; ZORNOZA, T.; GRANERO, L.; POLACHE, A. Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 9-22, jan 2005.

CHEN, K.; CERUTTI, A. Vaccination Strategies to Promote Mucosal Antibody Responses. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 479-491, 29 out 2010.

CONE, R. A. Barrier properties of mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 2, p. 75-85, 27 fev 2009.

CSABA, N.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ALONSO, MARIA JOSE. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 205-214, 1 dez 2009.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D. C.; NASCIMENTO, R. F.; LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 160-163, 2008.

DUDHANI, A. R.; KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 243-251, 11 jun 2010.

EVANS, C. M.; KOO, J. S. Airway mucus: The good, the bad, the sticky. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 121, n. 3, p. 332-348, mar 2009.

FUJIIHASHI, K.; MCGHEE, J. R. Th1/Th2/Th3 Cells for Regulation of Mucosal Immunity, Tolerance, and Inflammation. **Mucosal Immunology (Third Edition)**. Burlington: Academic Press, 2005. p. 539-558.

GUPTA, P. N.; VYAS, SURESH P. Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 118-125, 1 jan 2011.

HENNING, A.; SCHNEIDER, M.; NAFEE, N. *et al.* Influence of Particle Size and Material Properties on Mucociliary Clearance from the Airways. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 23, n. 4, p. 1-9, 2010.

HUANG, Y.; LAPITSKY, Y. Monovalent Salt Enhances Colloidal Stability during the Formation of Chitosan/Tripolyphosphate Microgels. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10392-10399, 2011.

HWANG, S.-M.; CHEN, C.-Y.; CHEN, S.-S.; CHEN, J.-C. Chitinous Materials Inhibit Nitric Oxide Production by Activated RAW 264.7 Macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, n. 1, p. 229-233, 29 abr 2000.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 51, n. 1-3, p. 81-96, 23 set 2001.

ISSA, M. M.; KÖPING-HÖGGÅRD, M.; ARTURSSON, P. Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2005.

JAGANATHAN, K. S.; VYAS, SURESH P. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally. **Vaccine**, v. 24, n. 19, p. 4201-4211, 8 maio 2006.

JAIN, A. K.; GOYAL, A. K.; MISHRA, N. *et al.* PEG-PLA-PEG block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1-2, p. 253-262, 15 mar 2010.

JAN, R.-H.; LIN, Y.-L.; CHEN, L.-K. *et al.* Hepatitis B virus surface antigen can activate dendritic cells and modulate T helper type immune response. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 1, p. 51-59, 2011.

JANES, K. A.; ALONSO, M. J. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: Preparation and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 12, p. 2769-2776, 20 jun 2003.

KANG, M. L.; CHO, C. S.; YOO, H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 857-865, 2009.

KELSALL, B. L.; LEON, F.; SMYTHIES, L. E.; SMITH, P. D. Antigen Handling and Presentation by Mucosal Dendritic Cells and Macrophages. **Mucosal Immunology (Third Edition)**. Burlington: Academic Press, 2005. p. 451-485.

KIM, B.-G.; KANG, I.-J. Evaluation of the effects of biodegradable nanoparticles on a vaccine delivery system using AFM, SEM, and TEM. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1168-1173, set 2008.

KIYONO, HIROSHI; FUKUYAMA, S. NALT- versus PEYER'S-patch-mediated mucosal immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 9, p. 699-710, 2004.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. DE. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEBRE, F.; BORCHARD, G.; LIMA, M. C. P.; BORGES, O. Progress Towards a Needle-Free Hepatitis B Vaccine. **Pharmaceutical Research**, nov 2010.

LEFRANÇOIS, L. Cytotoxic T Cells of the Mucosal Immune System. **Mucosal Immunology (Third Edition)**. Burlington: Academic Press, 2005. p. 559-564.

LIANG, T. J. Hepatitis B: The virus and disease. **Hepatology**, v. 49, n. S5, p. S13-S21, 1 maio 2009.

LIU, H.; GAO, C. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 20, n. 7, p. 613-619, 2009.

LUO, Y.; ZHANG, B.; CHENG, W.-H.; WANG, Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 942-951, 15 out 2010.

MANGAL, S.; PAWAR, D.; GARG, N. K. *et al.* Pharmaceutical and immunological evaluation of mucoadhesive nanoparticles based delivery system(s) administered intranasally. **Vaccine**, v. 29, n. 31, p. 4953-4962, 12 jul 2011.

MARTTIN, E.; SCHIPPER, N. G. M.; VERHOEF, J. C.; MERKUS, F. W. H. M. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 29, n. 1-2, p. 13-38, 5 jan 1998.

MCGILL, S. L.; SMYTH, H. D. C. Disruption of the Mucus Barrier by Topically Applied Exogenous Particles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 2280-2288, 6 dez 2010.

MEDINA, E.; GUZMÁN, C. A. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. **Vaccine**, v. 19, n. 13-14, p. 1573-1580, 8 fev 2001.

MESTECKY, J.; RUSSELL, M. W. Specific antibody activity, glycan heterogeneity and polyreactivity contribute to the protective activity of S-IgA at mucosal surfaces. **Immunology Letters**, v. 124, n. 2, p. 57-62, 4 jun 2009.

NASTI, A.; ZAKI, N. M.; LEONARDIS, P. *et al.* Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1918-1930, jun 2009.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 148-158, fev 2006.

OOI, E. H.; PSALTIS, A. J.; WITTERICK, I. J.; WORMALD, P.-J. Innate Immunity. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 473-487, jun 2010.

PAREZ, N.; FOURGEUX, C.; MOHAMED, A. *et al.* Rectal Immunization with Rotavirus Virus-Like Particles Induces Systemic and Mucosal Humoral Immune Responses and Protects Mice against Rotavirus Infection. **J. Virol.**, v. 80, n. 4, p. 1752-1761, 15 fev 2006.

PATTANI, A.; PATRAVALE, V. B.; PANICKER, L.; POTDAR, P. D. Immunological Effects and Membrane Interactions of Chitosan Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 2, p. 345-352, 6 abr 2009.

PORPORATTO, C.; BIANCO, I. D.; CORREA, S. G. Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 1, p. 62-69, 1 jul 2005.

PREGO, C.; PAOLICELLI, P.; DÍAZ, B. *et al.* Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. **Vaccine**, v. 28, n. 14, p. 2607-2614, 19 mar 2010.

PROTZER, U.; SCHALLER, H. Immune Escape by Hepatitis B Viruses. **Virus Genes**, v. 21, p. 27-37, 2000.

QIAO, Y.; RUAN, Y.; XIONG, C. *et al.* Chitosan oligosaccharides suppressant LPS binding to TLR4/MD-2 receptor complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 405-411, 5 set 2010.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, jul 2006.

SANTOS, J. E. DOS; SOARES, J. DA P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, p. 242-249, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. DE L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHIBATA, Y.; METZGER, W.; MYRVIK, Q. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 5, p. 2462 -2467, 1997.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R. DOS; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S. *et al.* Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p. 1-33, 15 abr 2004.

SIVAKUMAR, S. M.; SUKUMARAN, N.; NIRMALA, L. *et al.* Immunopotential of Hepatitis B Vaccine Using Biodegradable Polymers as an Adjuvant. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 4, p. 265-270, ago 2010.

SLÜTTER, B.; BAL, S.; KEIJZER, C. *et al.* Nasal vaccination with N-trimethyl chitosan and PLGA based nanoparticles: Nanoparticle characteristics determine quality and strength of the antibody response in mice against the encapsulated antigen. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6282-6291, 31 ago 2010.

STANLEY, A. C.; BUXTON, D.; INNES, E. A.; HUNTLEY, J. F. Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 3929-3941, 28 set 2004.

STORNI, T.; KÜNDIG, T. M.; SENTI, G.; JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 3, p. 333-355, 10 jan 2005.

TAFAGHODI, M.; SALUJA, V.; KERSTEN, G. F. A. *et al.* Hepatitis B surface antigen nanoparticles coated with chitosan and trimethyl chitosan: Impact of formulation on physicochemical and immunological characteristics. **Vaccine**, v. 30, n. 36, p. 5341-5348, 3 ago 2012.

TAKAHASHI, I.; NOCHI, T.; YUKI, YOSHIKAZU; KIYONO, HIROSHI. New horizon of mucosal immunity and vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 352-358, jun 2009.

TANG, Z.-X.; QIAN, J.-Q.; SHI, L.-E. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1193-1197, maio 2006.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros**, v. 15, n. 4, 2005.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1-2, p. 13-32, 14 abr 2003.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; JANES, K. *et al.* Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 123-131, jan 2004.

VILLIERS, C.; CHEVALLET, M.; DIEMER, H. *et al.* From Secretome Analysis to Immunology. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 1252 -1264, 1 jun 2009.

VLLASALIU, D.; EXPOSITO-HARRIS, R.; HERAS, A. *et al.* Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1-2, p. 183-193, 15 nov 2010.

VOYNOW, J. A.; RUBIN, B. K. Mucins, Mucus, and Sputum. **Chest**, v. 135, n. 2, p. 505 -512, 1 fev 2009.

WEN, Z.-S.; XU, Y.-L.; ZOU, X.-T.; XU, Z.-R. Chitosan Nanoparticles Act as an Adjuvant to Promote both Th1 and Th2 Immune Responses Induced by Ovalbumin in Mice. v. 9, n. 6, p. 1038-1055, 2011.

XU, Y.; DU, YUMIN. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215-226, 2 jan 2003.

YOON, H. J.; MOON, M. E.; PARK, H. S.; IM, S. Y.; KIM, Y. H. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 3, p. 954-959, 6 jul 2007.

YU, S.; ZHAO, Y.; WU, F. *et al.* Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, n. 1-2, p. 11-23, 20 ago 2004.

YUKI, Y.; KIYONO, H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. **Reviews in Medical Virology**, v. 13, n. 5, p. 293-310, 2003.

ZAHAROFF, D. A.; ROGERS, C. J.; HANCE, K. W.; SCHLOM, J.; GREINER, J. W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. **Vaccine**, v. 25, n. 11, p. 2085-2094, 1 mar 2007.

ZHANG, XINGE; ZHANG, HUIJIE; WU, Z. *et al.* Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 526-534, mar 2008.

7. ANEXOS 7.1. Antígeno recombinante do vírus da hepatite B.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

Serv. Virol. nº 056/11

São Paulo, 22 de julho de 2011

Ao

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Conforme solicitado e autorizado pela Sra. Diretora da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, deste Instituto, estamos entregando 8,0 mL do Antígeno de Superfície Recombinante do Vírus da Hepatite B, Produto Concentrado Acabado a Granel, Lote IB/HB/PAG 039/10, na concentração de 456 µg/mL, para o desenvolvimento do trabalho “Nanopartículas de quitosana como veículo de vacinação contra a hepatite B por via nasal”, tese de pós-graduação do aluno Jony Takao Yoshida, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP.

Atenciosamente,

Elisabeth C. N. Tenório
Diretora
Serviço de Virologia

Recebido por:

Data: 22/07/2011

7.2. Certificado da Comissão de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/69/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **“Nanopartículas de Quitosana Como Veículo de Vacinação Contra a Hepatite B por via Nasal”** (Protocolo CEUA/FCF/327), de responsabilidade do pesquisador **Jony Takao Yoshida** sob a orientação do Prof. Dr. Marco Antonio Stephano, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de julho de 2011.

São Paulo, 04 de julho de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP