



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

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.

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.

7. CONCLUSÃO

Os lipossomas aniônicos e catiônicos contendo OVA adicionados ou não de NPAG apresentaram tamanho, PDI, 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.; MAKSYMUK, 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 pharmaceuticals**, 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. GHAFFAR, 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.; TOMAŠIĆ, 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.; MICHAILIDIS, 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. PORNATTANANANGKUL, 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.; KISSENPENNIG, 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 acroître 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.; RADSAK, 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.