

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOÃO CARLOS VILELA VIEIRA JÚNIOR

**Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas
ao ácido poliinosínico-policitidílico poli (I:C) sobre o fenótipo de células
dendríticas**

Alfenas/MG

2021

JOÃO CARLOS VILELA VIEIRA JÚNIOR

Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitídílico poli (I:C) sobre o fenótipo de células dendríticas

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

V658a Vieira Júnior, João Carlos Vilela.
Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico poli (I:C) sobre o fenótipo de células dendríticas. / João Carlos Vilela Vieira Júnior. – Alfenas/MG, 2021.
58f. : il. --
Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Células Dendríticas. 3. Soroalbumina Bovina. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

CDD-570

JOÃO CARLOS VILELA VIEIRA JÚNIOR

Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policidídílico poli (I:C) sobre o fenótipo de células dendríticas

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 26 de março de 2021.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. José Carlos Magalhães
Instituição: Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 26/03/2021, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 26/03/2021, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOSE CARLOS DE MAGALHAES, Usuário Externo**, em 26/03/2021, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0486376** e o código CRC **9C230C0D**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre fizeram tudo por mim.

À minha avó por toda a assistência e paciência, ao meu avô pelas sábias palavras acolhedoras, as minhas irmãs e meus sobrinhos que sempre me incentivaram.

Aos meus tios e primos que sempre me acompanharam.

Aos amigos que são a família que escolhemos, por terem me incentivado nos momentos mais difíceis tanto em sala de aula quanto fora.

À família Terceti, pelo carinho.

À Universidade Federal de Alfenas e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por terem passado conhecimentos e experiências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pelos conhecimentos transmitidos, por ser um exemplo de dedicação ao ensino, pela enorme paciência e atenção e acolhimento.

Aos meus amigos do Laboratório de Vacinas, por ter me proporcionado momentos de risada e pedidos de ajuda, que tornaram toda a minha estadia no laboratório em momentos inesquecíveis. Em especial ao Renato pelo apoio, pois sem ele não seria capaz de realizar a metade dos experimentos e João Vitório, por compartilhar conhecimentos adquiridos nas disciplinas de Bases Moleculares e celulares da Interação Patógeno-Hospedeiro e Revisão Sistemática em Fisiopatologia, vocês foram essenciais para realização e sucesso deste trabalho.

Aos amigos de caminhada Ana Letícia, Elaine, Paulo, Valquíria, Kelly, pelo companheirismo e risadas.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios de Vacinas e do Dpto. de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG.

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Nanopartículas são estruturas microscópicas que possuem dimensões na faixa de tamanho em torno de 1 nm a 100 nm. As nanopartículas podem atuar como sistemas de entrega de antígenos em formulações vacinas. A maioria das nanopartículas (NPs) possui baixa toxicidade quando são inoculadas ou injetadas em animais. A magnitude da toxicidade das NPs depende de inúmeros fatores, tais como material, via de administração da exposição, tamanho e forma. Elas podem induzir inflamação envolvendo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e outras células efectoras. As células dendríticas (DCs), possuem papel fundamental na mediação da resposta imune inata e na indução da resposta imune adaptativa. A albumina é um polímero natural, biocompatível, biodegradável, não tóxico e não imunogênico e, devido a essas características, as NPs feitas de albumina são promissores sistemas de administração de medicamentos ou antígenos. O presente trabalho possui o objetivo, de produzir e avaliar o efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) associadas ao ácido poliinosínico-policidílico (NPPI) sobre o fenótipo de células dendríticas derivadas de medula óssea. No preparo das NPPI foi utilizada a técnica de co-acervação e ligação cruzada com glutaraldeído. Foi feita a análise por DLS, que mostrou que as nanopartículas produzidas em dois pHs testados (5,0 e 7,0) apresentaram resultados discordantes em relação ao tamanho, carga e PDI. As NPPI produzidas em pH 7,0 tiveram um menor tamanho e menor índice de PDI, a partir de então todos os experimentos foram realizados com esse pH. O tamanho da partícula, a sua distribuição e o potencial Zeta foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de Luz. A morfologia das NPs foi determinada por microscopia de força atômica. As NPPI apresentam tamanho de $497 \pm 140,4$ nm, carga de $-33,66 \pm 3,93$ mV, PDI de $0,38 \pm 0,06$ e forma esférica. As análises para determinar a taxa de encapsulamento indicam que se obteve 100% de encapsulamento do ácido poliinosínico-policidílico poli (I:C). Células da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram obtidas e diferenciadas em células dendríticas. Para verificar a estabilidade das NPPI em diferentes temperaturas, estas foram incubadas a 4°C e 37°C por 1, 2, 4 e 7 dias. O primeiro parâmetro a ser analisado foi a quantificação de poli (I:C) no sobrenadante das nanopartículas após a incubação. Os resultados indicaram, que os valores de densidade de ótica (D.O), foram relativamente baixos, indicando que não houve a liberação de poli (I:C) até o sétimo dia de análise. As células foram tratadas com as nanopartículas por 48 horas e o estado de ativação e maturação das células dendríticas foi monitorado através de qPCR para o mRNA IFN- β , CD40 e CD86. Os resultados indicaram um aumento da expressão do mRNA dos genes IFN- β e CD40 nas células tratadas com NPPI. A análise histopatológica da pele de animais inoculados com NPPI demonstrou o recrutamento de células inflamatórias na pele. Os animais do grupo NPVs, apresentaram áreas epidérmicas livre de queratina, e leve aumento da celularidade na derme profunda. Os animais dos grupos NPPI e poli (I:C) apresentaram padrão morfológico epidérmico semelhante ao grupo PBS. Em relação a contagem de células no tecido analisado foi possível observar um aumento significativo da celularidade em todos os grupos tratados com nanopartículas (NPPI, NPVs) e no

grupo inoculado com poli (I:C). Portanto, os resultados demonstraram o potencial das NPPI em serem utilizadas como adjuvante em plataformas vacinais.

Palavras-chave: Nanopartículas, células dendríticas, albumina sérica bovina.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) are microscopic structures that have dimensions between 1 nm to 100 nm and can act as delivery systems for antigens on vaccine formulations. NPs can have low toxicity when they are inoculated or injected into animals. The toxicity of NPs depends on several factors, such as type of material, route of administration, size and shape. NPs can induce inflammation with involvement of neutrophils, macrophages, dendritic cells and other effector cells. Dendritic cells (DCs) have a fundamental role in mediating the innate immune response and in the induction of the adaptive immune response. Albumin is a natural, biocompatible, biodegradable, non-toxic and non-immunogenic polymer and, due to these characteristics, albumin NPs are promising for develop drug or antigen delivery systems. The present work aims to produce and evaluate the effect of bovine serum albumin nanoparticles associated with polyinosinic-polycytidyl acid (NPPI) on the phenotype of bone marrow derived dendritic cells. The particle size, its distribution and the Zeta potential were determined by the dynamic light scattering technique. The morphology of NPs was determined by atomic force microscopy. The BSA nanoparticles containing polyinosinic-polycytidyl acid poly (I: C) have a $497\pm 140,4$ nm, $-33,66\pm 3,93$ mV, PDI of $0,38\pm 0,06$ and a spherical shape. Studies for determinate the encapsulation rate indicate that 100% of poly (I: C) encapsulation was obtained. Bone marrow derived cells from C57BL/6 mice were obtained and differentiated into dendritic cells (DCs). DCs were treated with the nanoparticles for 48 hours and the state of activation and maturation of these cells were monitored using qPCR for the IFN- β , CD40 and CD86 mRNAs. The results indicate an increase in mRNA expression of the IFN- β and CD40 genes in cells treated with NPPI. Histopathological analysis of the skin of animals inoculated with NPPI showed recruitment of inflammatory cells in the skin. Therefore, the results demonstrated the potential of NPPI to be used as an adjuvant in vaccine platforms.

Keywords: Nanoparticles, dendritic cells, bovine serum albumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Mecanismo de ação dos adjuvantes sobre o sistema imunológico...	20
Figura 2	- Microscopia de Força Atômica de nanopartículas de BSA contendo poli (I:C)	36
Figura 3	- Avaliação do encapsulamento de poli (I:C) nas nanopartículas de BSA.....	37
Figura 4	- Teste de estabilidade das nanopartículas de contendo poli (I:C) nas temperaturas de 4°C e 37°C.....	38
Figura 5	- Análise da captura de nanopartículas por células dendríticas derivadas da medula óssea.....	39
Figura 6	- Análise da expressão gênica de IFN- β , CD40 e CD86 em células dendríticas derivadas da medula óssea tratadas com NPs.....	40
Figura 7	- Imagens microscópicas representativas da pele de camundongos tratados com nanopartículas contendo poli (I:C)	41
Figura 8	- Diagrama de campo com a categorização semi-quantitativa da celularidade dérmica na pele de camundongos tratados com nanopartículas de BSA contendo poli (I:C)	42

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	- Genes alvos e oligonucleotídeos utilizados.....	33
Tabela 1	- Caracterização de nanopartículas de BSA contendo poli (I:C) produzidas em diferentes pHs.....	35
Tabela 2	- Tamanho, carga e PDI das Nanopartículas utilizadas nesse estudo.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	-	microscopia de força atômica
APCs	-	células apresentadoras de antígenos
BHK-21	-	Linhagem Celular de Fibroblastos de rim de Hamster Chinês
BSA	-	albumina sérica bovina
CDDs	-	células dendríticas dérmicas
CEUA-UNIFAL	-	Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Alfenas
DAMPs	-	Padrões moleculares associados a danos
DAPI	-	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DCs	-	células dendríticas
DCsMO	-	células dendríticas derivadas da medula óssea
DENV	-	dengue vírus
DLS	-	dispersão dinâmica de luz
DMEM	-	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
D.O	-	densidade ótica
dsRNA	-	RNA de fita dupla
EDTA	-	ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	-	Isotiocianato de fluoresceína
Flt3L	-	ligante tirosina quinase-3 tipo fms
GM-CSF	-	fator estimulador de colônias de monócitos
HSA	-	albumina sérica humana
IFNs I	-	Interferons do tipo I
IgG	-	Imunoglobulina do tipo G
IL-4	-	interleucina-4
IL-6	-	interleucina-6
IL-12p70	-	interleucina-12, p70
IRF	-	fatores de transcrição induzidos por interferon
LCs	-	células de Langerhans
MDA-5	-	enzima dsRNA helicase do tipo receptor de RIG-I
mDCs	-	células dendríticas mielóides
mg	-	miligrama

MHC	- complexo principal de histocompatibilidade
mL	- mililitro
mm	- milímetro
mM	- milimolar
MPLA	- Monofosforil Lipídeo A
mV	- milivolts
ng	- nanograma
NLR	- receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo
nm	- nanômetros
NOD	- receptores de oligomerização de ligação de nucleotídeos
NPPI	- nanopartículas de BSA associadas a poli (I:C)
NPs	- nanopartículas
NPVs	- nanopartículas vazias
OVA	- ovoalbumina
<i>P. aeruginosa</i>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMPs	- padrões moleculares associados a patógenos
PBS	- salina fosfatada tamponada
PDI	- Índice de Polidispersão
pH	- potencial hidrogeniônico
PKR	- proteína quinase R
poli (I:C)	- ácido poliinosínico-policitídico
PRRs	- receptores de reconhecimento de padrões
qPCR	- PCR em tempo real quantitativa
RAW 264.7	- Linhagem Celular de Macrófagos Murino
RIG-I	- receptor de reconhecimento de padrão citosólico
rNS1	- proteína recombinante não estrutural 1
rpm	- rotações por minuto
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute - meio
SFB	- soro fetal bovino
TBE	- Tris-borato-EDTA
TCD4 ⁺	- linfócitos auxiliares
TCD8 ⁺	- linfócitos citotóxicos

Th1	- resposta imune do tipo Th1
Th2	- resposta imune do tipo Th2
Th17	- resposta imune do tipo Th17
TLR	- receptor Toll Like
T <i>naive</i>	- células T que nunca entraram em contato com um antígeno diferente
TRP2	- proteína relacionada à tirosinase 2
USFDA	- Agência de Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µm	- micrômetro
µM	- micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Vacinas.....	18
2.2	Adjuvantes.....	18
2.3	Células dendríticas e vacinas.....	20
2.4	Nanopartículas vacinais	22
2.5	Nanopartículas e ligantes TLR.....	24
2.6	Nanopartículas de BSA.....	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Produção das nanopartículas.....	29
4.2	Caracterização das nanopartículas	29
4.3	Quantificação do ensapsulamento de poli (I:C) nas nanopartículas.....	30
4.4	Teste de estabilidade	30
4.5	Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea.....	31
4.6	Ensaio de captura.....	31
4.7	Quantificação de marcadores de diferenciação de células dendríticas por qPCR.....	32
4.8	Processamento histológico da pele.....	33
4.9	Análise histopatológica da pele	34
4.10	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Caracterização e padronização de nanopartículas	35
5.2	Caracterização do efeito das nanopartículas de BSA contendo poli (I:C) em células dendríticas derivadas de medula óssea.....	38
5.3	Efeito do tratamento no fenótipo das células dendríticas derivadas de medula óssea.....	40
5.4	Análise histopatológica.....	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	47

REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE.....	59

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas são estruturas microscópicas que apresentam medidas na faixa de tamanho em torno de 1nm a 100nm (VERT *et al.*, 2012). Existem diferentes tipos de nanopartículas, que podem ser compostas por metais inorgânicos, tais como o ouro, a prata e o carbono. Outras podem ser compostas por óxidos metálicos, tais como o óxido de titânio e o de ferro. Já as nanopartículas biodegradáveis podem ser compostas de materiais orgânicos, tais como lipídeos, proteínas e polissacarídeos, ou por polímeros orgânicos, tais como o poliestireno (MOHAMUD *et al.*, 2014).

Regularmente as nanopartículas têm sido utilizadas como sistemas de entrega de antígenos ou carreadores vacinais, pois elas podem proteger o imunógeno carregado de fatores que induzem a sua decomposição. Além disso, podem ampliar a administração da vacina favorecendo a absorção destas pelo epitélio e disposição intracelular do imunógeno, acelerando ou melhorando a resposta imune (RODRIGUES, 2013; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2020).

As nanopartículas têm sido propostas como uma ferramenta de grande potencial em imunoterapias devido às suas vantajosas propriedades que incluem tamanho e formas personalizáveis, funcionalidade da superfície e biocompatibilidade. As nanopartículas também podem induzir a ativação do complemento, a qual fornece um sinal para a resposta de células do sistema imune, tais como células dendríticas, linfócitos B e T. A ativação local do complemento pelas nanopartículas pode ser desejável, pois é capaz de aumentar a apresentação de antígenos. A interação das nanopartículas com o sistema imunológico pode ocorrer de diversas formas diferentes, podendo provocar inflamação com o envolvimento de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e outras células efetoras (SMITH; SIMON; BAKER JR, 2013; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013).

A albumina sérica tem sido considerada um material promissor para produzir nanopartículas para uso em bioimagem e administração de medicamentos (AN; ZHANG, 2017). Albumina foi uma das primeiras moléculas de escolha em sistemas carreadores de fármacos e uma das primeiras nanopartículas aprovadas pela agência de Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (USFDA-EUA) (ZHAO *et al.*, 2010; PARK, 2012). A albumina é um polímero natural, biocompatível, biodegradável, não tóxico e não imunogênico e, em razão dessas

características são prósperos sistemas de aplicação de fármacos ou antígenos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

Existem dois tipos de albumina empregados na criação de nanopartículas, a albumina sérica humana (HSA) e albumina sérica bovina (BSA). Os dois tipos partilham de diversas características, tais como alta solubilidade em água, meia vida longa no sangue, peso molecular semelhante e número semelhante de resíduos de aminoácidos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; AN; ZHANG, 2017).

Estudos mostram que nanopartículas de BSA, são boas carreadoras de fármacos, liberando os medicamentos conjugados nos locais de interesse e aumentando a concentração do fármaco no tecido (ZU *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010). A BSA tem sido utilizada para preparação de nanopartículas devido a sua estrutura primária bem definida em conjunto com a vantagem de permitir a modificação da sua superfície. A proteína oferece vários locais alvo para modificação covalente, tais como grupos amino livres. Além disso, a técnica de preparo das NPs associadas a BSA já está bem estabelecida (KOUCHAKZADEH *et al.*, 2010).

Estratégias para desenvolver novos veículos de entrega são críticas no desenvolvimento de novos adjuvantes vacinais. Nanopartículas que encapsulam antígenos e adjuvantes são veículos promissores para fornecer antígenos e sinais ativadores para as células apresentadoras de antígeno (APCs), permitindo respostas imunes ideais contra um patógeno específico (LIMA *et al.*, 2013; KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2020).

Um adjuvante é definido como a substância normalmente utilizada com um antígeno para aumentar as suas propriedades imunogênicas através da ativação da resposta imune inata e adaptativa (SHAKYA; NANDAKUMAR, 2013). Estudos recentes têm demonstrado que a entrega de antígenos por nanopartículas pode melhorar significativamente a imunogenicidade de vacinas devido à intrínseca propriedade imunoestimulatória dos materiais (SAHDEV; OCHYL; MOON, 2014). Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, do Laboratório de Vacinas da Universidade Federal de Alfenas, demonstraram a aplicabilidade de NPs associadas a BSA como potenciais plataformas vacinais. Essas nanopartículas são biodegradáveis, fáceis de preparar, executáveis e bem admissíveis, sobretudo pelo fato de a matriz da albumina ser capaz de incorporar diversos tipos de compostos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; SILVA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013;

MORAES *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Apesar dos resultados promissores obtidos pelos trabalhos anteriores de nosso grupo, ainda não se sabe qual o efeito das nanopartículas contendo BSA sobre as células dendríticas e se modificações nessas nanopartículas podem melhorar a atividades das células dendríticas. O ácido polinosônico-policitidílico poli (I:C) é um análogo sintético do RNA de fita dupla (dsRNA). O dsRNA é um padrão molecular associado à infecção viral que é reconhecido por receptores de padrão molecular. O poli (I:C) ativa os receptores de reconhecimento de padrões TLR3, RIG-I/MDA5 e PKR, induzindo assim a sinalização por várias vias inflamatórias, incluindo as vias de indução da ativação do NF- κ B e dos fatores regulatórios de interferon (IRF). O poli (I:C) pode estimular a liberação de citocinas inflamatórias e, ao induzir a produção de interferon-gama, pode aumentar o número e as atividades tumoricidas de várias células imunológicas (PALCHETTI *et al.*, 2015). É sabido também que essa molécula pode influenciar a maturação de células dendríticas, modificando o fenótipo imaturo para maduro e contribuindo dessa forma, para uma melhor ativação de células T. Dessa forma, esse projeto visa primeiramente aprofundar no estudo dos efeitos das nanopartículas de albumina sérica sobre as células dendríticas, produzindo e avaliando o efeito de NPs contendo BSA associadas ao poli (I:C) sobre o processo de diferenciação das células dendríticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vacinas

A vacinação emergiu como a descoberta médica mais eficaz e economicamente viável para melhorar a saúde pública. O uso de vacinas salvou e ainda salva milhões de vidas em todo o mundo. Certas doenças como varíola, poliomielite e sarampo foram erradicadas ou controladas através da vacinação (GUY, 2007). As vacinas representam a estratégia de intervenção com a melhor relação custo-benefício aplicada em saúde pública. Avanços biotecnológicos em diversas áreas de pesquisa têm contribuído para o desenvolvimento de formulações mais seguras e eficazes. Além disso, a aplicação de ferramentas biotecnológicas no desenvolvimento de vacinas tem provocado mudanças na maneira como se pensa e produz esses reagentes tanto para uso em humanos como em animais (DINIZ; FERREIRA, 2010). Apesar do notável sucesso da vacinação contra alguns tipos de doenças, ainda existem várias doenças infecciosas para as quais as vacinas ainda não estão disponíveis (AZMI *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, a maioria das formulações vacinais consiste em microrganismos vivos atenuados ou inativados. Porém, problemas como reações indesejadas do hospedeiro, reversão à virulência, indução de doenças graves em indivíduos imunocomprometidos e dificuldades em cultivar os microrganismos patogênicos estão frequentemente associados à abordagem tradicional da vacina (LEVINE; SZTEIN, 2004). Essas dificuldades da aplicação das vacinas tradicionais resultaram no surgimento de vacinas compostas de antígenos purificados. Geralmente, essas vacinas são seguras, pois não possuem todos os componentes estruturais dos patógenos (AZMI *et al.*, 2014).

2.2 Adjuvantes

Originalmente, os adjuvantes foram descritos por Ramon em 1924, como substâncias potencializadoras da resposta imune a um antígeno. Essas substâncias são capazes de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce elevada e duradoura (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013). Muita atenção tem sido dispensada aos adjuvantes em razão do

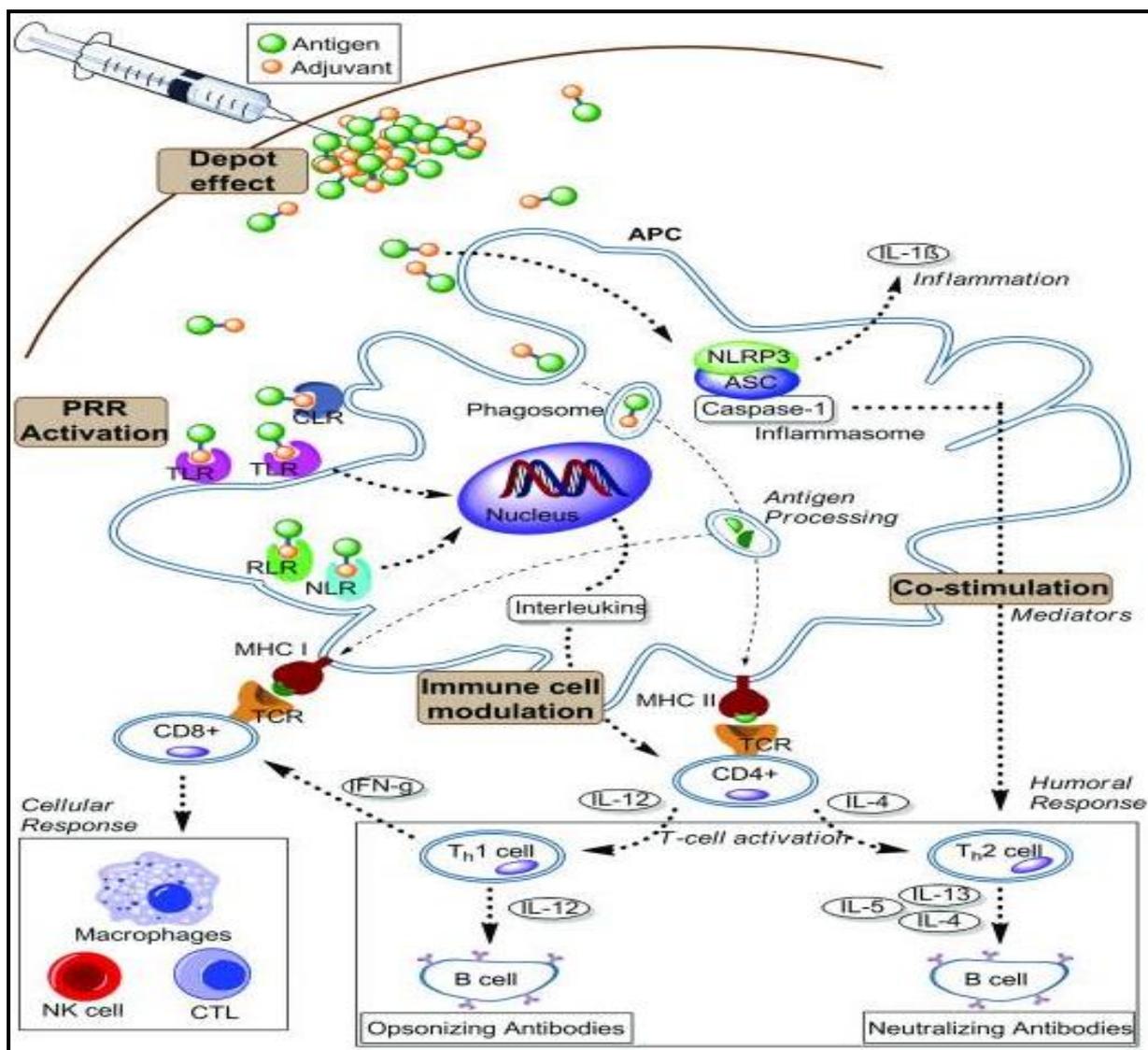
desenvolvimento de vacinas compostas de proteínas purificadas ou que utilizam subunidades de antígenos. Esses componentes vacinais geralmente se apresentam como fracos imunógenos, requerendo adjuvantes para desencadear uma resposta imunológica protetora (AZMI *et al.*, 2014).

Diversos mecanismos de ação são apresentados pelos adjuvantes e devem ser selecionados com base na rota de administração e na imunidade requerida pelo tipo de vacina particular (imunidade humoral, celular ou de mucosa). Os adjuvantes podem ser agrupados por sua capacidade de gerar eventos imunológicos necessários para induzir a resposta imune desejada (Figura 1). Como alguns adjuvantes atuam estimulando mais de uma via imunológica, a classificação alternativa por propriedades físicas e químicas pode ser mais útil. Os adjuvantes podem exibir seus efeitos imunoestimuladores através dos seguintes mecanismos: 1) fornecer um depósito de antígeno no local de administração favorecendo a constante liberação do antígeno e reconhecimento do mesmo por APCs; 2) ativação da imunidade inata através do envolvimento de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs); 3) ativação de sinais responsáveis pela co-estimulação de células imunes e 4) capacidade de imunomodulação e maturação de APCs (AZMI *et al.*, 2014).

Os adjuvantes podem ser usados para o aumento da imunogenicidade, diminuição da dosagem essencial de antígeno, aceleração da resposta imune, redução do número de imunizações recomendadas, aumento da duração da proteção, ou ainda, para a otimização da eficiência da imunização em indivíduos classificados como respondedores fracos. Os adjuvantes podem ser de substâncias naturais ou sintéticas e divididas em duas principais classes com base em seu mecanismo de ação: os adjuvantes carreadores e os imuno-estimulatórios (REED *et al.*, 2013).

O adjuvante mais apropriado para cada vacina depende amplamente do tipo de resposta imune necessária para o estabelecimento de imunidade protetora. Dessa forma, o estudo das características inflamatórias dos adjuvantes é importante na interpretação de sua capacidade de indução imunogênica e no entendimento dos efeitos colaterais associados ao seu uso (APOSTÓLICO *et al.*, 2016).

Figura 1 - Mecanismo de ação dos adjuvantes sobre o sistema imunológico.



Fonte: AZMI *et al.* (2014, p.3).

Legenda: APC: Célula Apresentadora de Antígeno; CTL: Linfócito T Citotóxico; célula NK: célula natural killer; PRR: Receptor de reconhecimento padrão; TLR: Receptor do tipo Toll Like; RLR: receptor semelhante ao gene I (RIG-I) indutível por ácido retinóico; NLR: receptor semelhante a NOD; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; NLRP3: família de receptores tipo NOD; ASC: adaptador de inflamassoma; TCR: receptor de célula T; CLR: receptores de lectina do tipo C.

2.3 Células dendríticas e vacinas

As células dendríticas (DCs) são as APCs mais potentes na promoção da ativação de células T e possuem mecanismos altamente eficazes para detectar e capturar antígenos e subsequentemente determinar a magnitude e a qualidade das

respostas imunes adaptativas (BOLTJES; VAN WIJK, 2014). Os subconjuntos de DCs nos órgãos linfóides ou na periferia são distinguidos pela expressão de moléculas de superfície específicas, algumas das quais podem ser direcionadas para alcançar a entrega controlada de antígenos e/ou adjuvantes. Isso inspirou investigações sobre abordagens de vacinação com DCs destinadas a ativar as respostas desejadas das células T e B (LEHMANN *et al.*, 2016; MACRI *et al.*, 2016).

As DCs são células heterogêneas produzidas na medula óssea em resposta a fatores de crescimento e diferenciação, tais como a ligante tirosina quinase-3 tipo fms (Flt3L) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). As DCs expressam um repertório de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo TLRs, RIG-I e MDA-5, bem como NLRs, e são capazes de reconhecer uma variedade de micro-organismos patogênicos (LONGHI *et al.*, 2009; PALM; MEDZHITOV, 2009).

As DCs são os principais determinantes da vacinação devido ao seu papel na ativação da resposta imune mediada pelas células T contra o antígeno. Na periferia, as DCs têm o papel de sentinelas que capturam e processam antígenos para apresentação pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) às células T. As moléculas de MHC-I apresentam antígenos às células TCD8⁺, enquanto as moléculas de MHC-II são reconhecidas especificamente pelas células TCD4⁺ (LONGHI *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2010).

A resposta imune induzida pelas DCs depende do ambiente em que o antígeno é capturado. Na ausência de sinais inflamatórios, as DCs são amplamente tolerogênicas. Por outro lado, em resposta à infecção, inflamação ou adjuvante vacinal, as DCs sofrem maturação para induzir resposta imune mediada por células T. As DCs maduras regulam positivamente as moléculas de MHC e as moléculas co-estimuladoras e produzem uma variedade de citocinas. Juntamente com a apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC, esse processo de maturação resulta na ativação de células T virgens e sua diferenciação em células T efetoras (LONGHI *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2010).

As DCs usam receptores Fc para internalização de complexos anticorpo-antígeno para processamento subsequente e apresentação a células T específicas. Para uma estimulação eficiente de células T auxiliares ou T citotóxicas, no entanto, as DCs precisam ser ativadas por sinais de perigo não específicos, tais

como os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (SEPULVEDA-TOEPFER *et al.*, 2019).

A interação de PAMPs e PRRs em DCs induz a maturação e ativação de DCs através da transcrição, tradução e secreção de citocinas inflamatórias e quimiocinas. As DCs ativadas, caracterizadas por maior capacidade de apresentação de antígeno, migram para os linfonodos drenantes e interagem com os linfócitos T, iniciando assim, o processo de ativação da imunidade adquirida. Os PRRs permitem que as DCs detectem sinais de perigo, tais como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou outras estruturas compartilhadas de vários patógenos presentes em fungos, bactérias, helmintos e vírus (JOFFRE *et al.*, 2009; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; BRENCICOVA; DIEBOLD, 2013; SWIECKI; COLONNA, 2015).

A diferenciação dos linfócitos é mediada por sinais das DCs ativadas que compreendem a apresentação de moléculas de MHC e peptídeos derivados de patógenos. Além disso, sinais de moléculas co-estimulatórias, incluindo CD80 e CD86, bem como os sinais instrucionais desencadeados por citocinas secretadas (por exemplo, IL-12p70 para Th1, IL-4 para Th2 e IL-6 e IL-23 para Th17) também estão presentes (LONGHI *et al.*, 2009).

Vários agonistas do TLR estão sendo avaliados como adjuvantes para o desenvolvimento de vacinas. Entre eles, o ácido poliinosínico-policidílico poli (I:C) que induz inflamação e imunidade duradoura às células T (STAHL-HENNING *et al.*, 2009). O poli (I:C) é reconhecido pelo receptor TLR3 localizado principalmente nas membranas endossômicas. Além disso, se liga ao RNA citoplasmático helicase MDA5, resultando na ativação do IRF-3 e representando uma via importante para a produção de IFNs do tipo I de maneira independente de TLR (LONGHI *et al.*, 2009). Em camundongos, o ácido poli (I:C) é conhecido há muito tempo como um forte indutor de interferons do tipo I e fornece atividade antiviral e adjuvante. O poli (I:C) também funciona como um adjuvante da mucosa para a indução de respostas imunes humoral e mediada por células (STAHL-HENNING *et al.*, 2009).

2.4 Nanopartículas vacinais

Nanopartículas (NPs) são definidas como dispersões particuladas ou partículas sólidas com tamanho entre 10-1000 nm que podem servir como sistema

de entrega de fármacos ou adjuvantes em vacinas sendo utilizadas em tratamentos de câncer, diabetes, alergias, infecções e inflamação (CHOW; HO, 2013). Dentre as razões que fazem as NPs serem usadas em tratamentos é o fato de possuírem grande área de superfície e possuir rápida absorção e liberação (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

As NPs vêm sendo produzidas e utilizadas em uma ampla gama de produtos em todo o mundo (SILVA *et al.*, 2017). NPs têm sido ativamente investigadas quanto à administração de antibióticos, ácidos nucleicos, peptídeos/proteínas e quimioterapêuticos (KIM; GRIFFITH; PANYAN, 2019). A nanotecnologia pode desenvolver NPs capazes de carrear moléculas imunomoduladoras naturais e/ou sintéticas, que irão fornecer não apenas uma entrega melhorada de antígenos (direcionando APCs e agindo como um depósito de antígenos), mas também tem um papel importante no início da imunidade, ou seja, o efeito adjuvante (YADAV *et al.*, 2018).

Em suma, NPs podem ser usadas como plataformas vacinais, pois são capazes de melhorar a apresentação e processamento de antígenos. Ainda podem ser usadas como adjuvantes capazes de ativar ou aumentar a resposta imune ao antígeno a ser administrado (KOUCHAKZADEH *et al.*, 2015). A modificação das superfícies das NPs com diferentes moléculas de direcionamento (ex: ligantes de receptores) permite a entrega de antígenos às APCs, estimulando assim, respostas imunes seletivas e específicas (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2020).

As NPs podem ainda proteger os antígenos vacinais contra a degradação rápida e aumentando a captação celular do antígeno por células imunes inatas. Uma das características mais desejadas dessas formulações é sua funcionalidade como um depósito de adjuvantes e antígenos, o qual pode permitir uma estimulação imunológica sustentada (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013).

As NPs são projetadas especificamente para atingir ou evitar interações com o sistema imunológico. Essa vantagem é atribuída ao tamanho de partícula em nanoescala que facilita a o reconhecimento e a captação do antígeno pelas células fagocíticas, e desta forma, facilita também o processo de apresentação de antígenos. A interação das NPs com os antígenos pode ser realizada de três maneiras diferentes: conjugação (ligação covalente), adsorção (na superfície das nanopartículas) e encapsulamento (dentro das nanopartículas) (SPETH *et al.*, 2017).

Formulações vacinais baseadas em NPs foram consideradas promissoras em diversos ensaios clínicos (CORREIA-PINTO; CSABA; ALONSO, 2012; GOMES; MOHSEN; BACHMANN, 2017; SPETH *et al.*, 2017). Entretanto, a aplicação de NPs ainda necessita de mais estudos, tendo em vista o fato de que os sistemas de entrega têm algumas desvantagens e limitações. A falta de conhecimento sobre a distribuição e a imprevisibilidade no processo de entrega, bem como o tamanho pequeno e a grande área de superfície do sistema de direcionamento e entrega que podem levar à agregação, dificultando o manuseio físico (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2020).

2.5 Nanopartículas e ligantes de TLR

Sistemas de entrega baseados em nanocarreadores são capazes de proteger os antígenos da degradação enzimática, de melhorar a estabilidade da formulação vacinal e também por possuir propriedades adjuvantes. As NPs podem ainda ser manipuladas para otimizar a resposta imune contra o antígeno através da indução de uma resposta específica de células apresentadoras de antígenos (ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013; JOSHI; GEARY; SALEM, 2013; PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). Os antígenos de interesse podem ser encapsulados dentro dos nanocarreadores ou serem adsorvidos à sua superfície. Já a adsorção superficial de antígenos e outros imunoestimuladores (por exemplo os ligantes de receptores do tipo toll) podem facilitar o processamento do antígeno e a ativação das células apresentadoras de antígenos. Essas alternativas podem resultar em uma ativação mais robusta da imunidade celular e humoral, tanto em nível sistêmico como localizado (imunidade de mucosa) se comparadas com o antígeno não-conjugado (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018; VIJAYAN *et al.*, 2019).

O descobrimento dos receptores para o reconhecimento de padrões de microrganismos (PRRs), tais como os receptores Toll-like (TLRs) e os receptores de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD), impactaram o desenvolvimento de novos adjuvantes capazes de produzir respostas imunes celulares necessárias para combater patógenos e células cancerosas. A interação dos PRRs com seus ligantes é capaz de influenciar as respostas imunes inata e adaptativa. Os TLRs podem ser expressos em na superfície celular (TLRs 1, 2, 4, 5 e 6) e meio intracelular (TLRs 3, 7, 8 e 9) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Sua

expressão pode ocorrer tanto em células do sistema imunológico, como em células cancerosas (KRYCZEK *et al.*, 2005).

Receptores do tipo NOD ou receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs), são receptores intracelulares, que possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), em virtude da entrada de patógenos por fagocitose ou por meio de poros na membrana. Além disso, são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMPs), estes amplamente relacionados ao estresse celular (MAHLA *et al.*, 2013). Estão localizados em linfócitos, macrófagos, células dendríticas e em células que não fazem parte do sistema imune, tais como células epiteliais, que possuem a função de formar uma barreira, na qual as bactérias precisam atravessar para que se estabeleça a infecção no corpo (FRANCHI *et al.*, 2008).

Os ligantes de TLRs são identificados por possuírem a habilidade de induzir a maturação de DCs, tendo com consequência a expressão de moléculas coestimuladoras e citocinas pró-inflamatórias (GIL-TORREGROSA *et al.*, 2004). Muitos adjuvantes, sob investigação ou aprovados para sua aplicabilidade em formulações vacinais são ligantes de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 ou TLR9, pois se assemelham aos PAMP bacteriano ou ao PAMP viral (MBOW *et al.*, 2010). De todos os TLRs, os que estão abrangidos no reconhecimento de ácidos nucleicos, tais como TLR3 e TLR7, são encontrados em compartimentos endolisossomais, (HU *et al.*, 2016) e são, portanto, excelentes moléculas a serem usadas na composição de nanopartículas com potencial adjuvante ou vacinação. O trabalho de (LYNN *et al.*, 2015), demonstrou a importância de combinar ligantes de TLR em nanopartículas como forma de induzir um aumento das respostas aos estímulos vacinais. Essa abordagem pode ser interessante para induzir imunidade protetora contra várias doenças, tais como como influenza (NEMBRINI *et al.*, 2011), câncer (HAMDY *et al.*, 2008), hepatite B (CHONG *et al.*, 2005) e encefalite do Nilo Ocidental (DEMENTO *et al.*, 2010).

Várias nanopartículas, compostas por diversos polímeros e associadas ao poli (I:C) tiveram sua ação imunoestimulatória comprovada. Nanopartículas magnéticas carregadoras de ovalbumina e associadas a ligantes de TLR3 poli (I:C), TLR7 (imiquimode) foram capazes de induzir resposta imune otimizada em modelo animal de melanoma (GONDAN *et al.*, 2018). Segundo (JEWELL; LÓPEZ; IRVINE,

2011), as micropartículas que carregam o poli (I:C), são imunogênicas, pois possuem habilidade de gerar um depósito extracelular que possibilita a liberação equilibrada e exposição duradoura do agonista de TLR3 no tecido. Estudos de (MULLER *et al.*, 2018), também mostraram que o encapsulamento de poli (I:C) em nanopartículas de quitosana foram capazes de induzir uma resposta imune benéfica ao processo de ativação de macrófagos com ampla capacidade anti-tumoral. Nanopartículas de fosfato de cálcio contendo poli (I:C) também foram capazes de induzir um efeito imunoestimulatório em ensaios *in vitro* e *in vivo* (SOKOLOVA *et al.*, 2017).

2.6 Nanopartículas de BSA

As albuminas do soro são as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo e correspondem a 60% do seu total de proteínas. São frequentemente utilizadas como proteínas-modelo para muitos estudos bioquímicos, físico-químicos e biofísicos (GELAMO *et al.*, 2002). A albumina pode ser utilizada como veículo para agentes terapêuticos, melhorando o perfil farmacocinético do fármaco, de modo que um grande número de terapias baseadas em albumina está atualmente na fase clínica de testes (WEISSIG; PETTINGER; MURDOCK, 2014).

Estudos com NPs contendo BSA (NPVs) apontam que estas são boas carreadoras de fármacos, liberando os medicamentos conjugados nos locais de interesse e aumentando a concentração da droga no tecido. A albumina tem sido uma das primeiras moléculas de escolha em sistemas carreadores de fármacos e foi uma das primeiras NPs aprovadas pela agência de Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (USFDA) (ZU *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010). A BSA tem sido utilizada para preparação de NPs devido a sua estrutura primária bem definida em conjunto com a vantagem de permitir a modificação da sua superfície. Essa proteína oferece vários locais alvo para modificação covalente, tais como grupos amino livres. Além disso, a técnica de preparo das NPVs já está bem estabelecida (KOUCHAKZADEH *et al.*, 2010).

As NPVs já são utilizadas por indústrias farmacêuticas como carreadoras e sistema de liberação de fármacos em tratamentos, principalmente contra câncer devido sua alta estabilidade em estoque e *in vivo*, alta capacidade de ligação com

substâncias, atoxicidade, reprodutibilidade e facilidade no aumento de escala durante a produção (KOUCHAKZADEH *et al.*, 2015).

De acordo com Silva *et al.* (2012), utilizando um modelo murino para avaliar a produção de IgG após a administração dos quatro sorotipos de DENV inativados e adsorvidos em NPs de soro bovino, observaram que esta formulação induziu uma produção de anticorpos anti-DENV IgG. Porém, os ensaios de neutralização da redução de placa com os quatro sorotipos de DENV revelaram que esses anticorpos não possuem atividade neutralizante nas diluições testadas. Os autores concluíram que, embora o sistema de nanopartículas induza respostas humorais contra o DENV, novas investigações com diferentes antígenos do DENV serão necessárias para melhorar a imunogenicidade, a especificidade do epítipo e a atividade funcional para tornar essa plataforma uma opção viável para as vacinas contra o DENV.

Segundo Rodrigues *et al.* (2013) camundongos vacinados com NPs contendo antígenos de *Pseudomona aeruginosa* apresentaram títulos de anticorpos IgG1 anti-*Pseudomonas* e redução dos sinais inflamatórios ocorridos no pulmão após a infecção com essa bactéria. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Moraes *et al.* (2018), onde os animais vacinados apresentaram maior taxa de sobrevivência, menor carga bacteriana pulmonar, produção controlada de citocinas e poucas alterações histopatológicas se comparadas aos animais não vacinados.

Em um estudo de Silva *et al.* (2018) que objetivou demonstrar o efeito de NPs contendo BSA na pele após a administração de NPs, os autores avaliaram a atividade pró-inflamatória usando modelos *in vivo* e observaram que NPs contendo BSA são facilmente absorvidos pelas células macrofágicas RAW 264.7 e BHK-21, sem citotoxicidade significativa. O exame histológico das seções da pele de camundongos tratados com NPs contendo BSA revelou intensa infiltração celular, aumento da espessura da pele, hipertrofia folicular, congestão vascular e colagênese acentuada. Camundongos imunizados com proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) do vírus da dengue 1 e NPs contendo BSA mostraram uma alta taxa de soroconversão se comparados aos animais imunizados apenas com rNS1. Portanto, o efeito de NPs contendo BSA na pele após a administração, tem uma relevância biotecnológica para o design racional de formulações de vacinas baseadas em nanocarreadores de albumina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policidílico poli (I:C) sobre o fenótipo de células dendríticas derivadas de medula óssea.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse projeto são:

- a) produzir e caracterizar em relação ao tamanho, carga e morfologia das nanopartículas de BSA associadas a poli (I:C);
- b) avaliar a captura dessas nanopartículas por células dendríticas derivadas de medula óssea;
- c) avaliar o efeito destas nanopartículas no fenótipo das células dendríticas derivadas de medula óssea;
- d) avaliar as alterações histopatológicas desencadeadas na pele de camundongos após a inoculação de nanopartículas de BSA associadas a poli (I:C).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção das nanopartículas

O preparo das NPs foi realizado segundo a técnica de co-acervação e ligação cruzada com glutaraldeído (RODRIGUES *et al.*, 2013). O poli (I:C) foi dissolvido em água deionizada estéril na concentração de 5mg/mL. A suspensão foi filtrada em filtros de seringa de 0,5 μ m e foram feitas alíquotas de 500 μ l em tubos estéreis de 1,5mL.

Foi também produzida uma solução de BSA em água estéril, com a concentração final (m/v) de 2%. Para a produção das nanopartículas de BSA associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico (NPPI), a cada 1mL da solução BSA 2% (pH 7,0 ou pH 5,0) foram adicionados 200 μ l de poli (I:C) a 5 mg/mL. A solução foi incubada por 30 minutos em agitação à temperatura ambiente. Após esse tempo, foi coletado uma alíquota de 100 μ L para análise do encapsulamento de poli (I:C) pelas NPs. Em seguida, foi realizada a etapa de dessolvatação, que consiste na adição de álcool etílico absoluto gota à gota sob agitação.

Após a formação da nanopartícula contendo poli (I:C), foi realizada a ligação cruzada através da adição de 25 μ L de glutaraldeído a 25%. A solução foi mantida sob agitação magnética por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término do tempo necessário para promover a ligação cruzada, as NPPI foram transferidas para tubos de 1,5mL e submetidas à centrifugação a 10.000 G durante 15 minutos, em seguida foi coletado o sobrenadante para avaliar o percentual de encapsulamento. O sedimento foi lavado uma vez com 1 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) estéril e centrifugado novamente conforme as condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em (PBS) na concentração de 10 mg/mL. Foram produzidas também nanopartículas vazias (NPVs) contendo apenas BSA (SILVA *et al.*, 2012).

4.2 Caracterização das nanopartículas

O potencial Zeta, o diâmetro médio e o índice de polidispersão da amostra foram determinados pela Técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS – Malvern Instruments Ltda Zeta sizer Nano ZS – Reino Unido) no Laboratório de Sistemas de

Liberação de Fármacos da UNIFAL-MG. Para a caracterização das NPPI e NPVs, essas foram diluídas para a concentração de 1mg/mL em PBS.

A análise morfológica das nanopartículas foi realizada no Centro de Microscopia da UNIFAL-MG, no Instituto de Ciências Exatas na Unidade Educacional II, SALA C 107 por de Microscopia de Força Atômica (AFM – Park Systems NX10 – Coréia do Sul). As NPs foram diluídas 1000 vezes e 80µl dessa solução das nanopartículas foram depositados sobre uma lamínula de vidro redonda de 13 mm e secas à temperatura ambiente.

4.3 Quantificação do encapsulamento de poli (I:C) nas nanoprtículas

Para analisar o percentual de encapsulamento da poli (I:C) pelas nanopartículas, foi utilizado o sobrenadante das preparações de nanopartículas coletados anteriormente e estes foram quantificados por um espectrofotômetro (Jenway Genova Nano 3-in-1). As leituras foram realizadas utilizando os sobrenadantes obtidos a partir da preparação das NPVs como branco. Todas as amostras foram lidas em triplicata, no comprimento de onda de 290nm. A presença de poli (I:C) nas nanopartículas foi também avaliada em gel de agarose de 1,5x. Foi preparado um gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1,5x. sobre um suporte (5 cm x 10 cm) para formar uma camada fina de gel. Após a solidificação o gel foi dividido na metade pelo eixo horizontal, separando a metade de cima para a adição de diferentes volumes de NPPI e a de baixo para NPVs. Foram adicionadas, portanto, 100, 50, 25 e 10 µg de nanopartículas misturadas a 2µl (diluído para 1X) de Gel Red (BIOTIUM). Após 15 minutos, o gel foi exposto ao transluminador de luz ultravioleta para visualização.

4.4 Teste de estabilidade

A solução de NPs (10 mg/mL) foi incubada a 4°C e 37°C por 1, 2, 4 e 7 dias. O tamanho e o potencial Zeta de NPs foram medidos usando DLS após a incubação no tempo desejado. As amostras incubadas foram então centrifugadas a 6.700 G por 15 minutos e o sobrenadante foi usado para quantificar ácido poliinosínico-policidílico poli (I:C) por densidade ótica (D.O) utilizando o comprimento de onda de 290nm.

4.5 Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea

Os camundongos C57BL/6 (n=3) foram eutanasiados com dose letal de anestésico (150µL de cetamina a 100mg/mL e 50µL de xilazina a 20mg/mL por animal) e mergulhados em álcool etílico 70% para evitar contaminação. O procedimento foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-UNIFAL), protocolo (0009/2020). Em cabine de segurança biológica classe II A2, os fêmures dos animais foram extraídos intactos e o tecido muscular retirado com auxílio de pinças e bisturi estéreis. Os fêmures foram colocados em placa de petri contendo álcool etílico a 70%, deixado por dois minutos e lavados em outra placa contendo meio RPMI e antibióticos (penicilina a 100 UI/L e estreptomicina a 10mg/L). Após a lavagem, foram cortadas as epífises de cada fêmur e com o auxílio de uma seringa de 1mL foi adicionado meio RPMI com antibióticos e Soro Fetal Bovino (SFB 10%), extraíndo, portanto, as células da medula óssea diretamente em tubos Falcon de 50mL estéreis. O procedimento foi repetido até os ossos ficarem translúcidos.

O tubo contendo as células foi preenchido com o mesmo meio usado na extração das células e levado a centrifugação por 1500 G por dez minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido com 1 mL de meio RPMI contendo antibióticos e (SFB 10%). As células foram contadas em câmara de Neubauer e ressuspendidas em meio até a concentração de 1×10^6 células/mL. As células foram transferidas para garrafas de cultura de células de 75cm² e então foram adicionados 10µL de fator de diferenciação GM-CSF a 20µg/mL para cada 10mL de meio. As células foram incubadas por uma semana em estufa contendo atmosfera de 5% de CO₂ e 37°C, havendo troca de meio contendo GM-CSF no terceiro dia.

4.6 Ensaio de captura

As células dendríticas derivadas da medula óssea (DCsMO) foram plaqueadas em lamínulas e postas em placas de cultura de tecidos de 24 poços (1×10^6 células/poço) e incubadas a 5% de CO₂ e 37°C, em uma incubadora por 24 horas. O meio de cultura foi substituído por 5% de DMEM contendo 500µg/mL de nanopartículas e incubado por 24 horas. Para remover nanopartículas livres, as

células foram lavadas duas vezes com PBS, (pH 7,4). As células foram fixadas com formaldeído a 10% em PBS, por 15 minutos. Posteriormente, as células foram coradas com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (SIGMA, EUA) por dez minutos à temperatura ambiente e depois lavadas com PBS. As lâminas foram montadas em uma gota de glicerol e vistas sob um microscópio fluorescente usando a objetiva 100x.

4.7 Quantificação de marcadores de diferenciação de células dendríticas por qPCR

A extração de RNA das DCsMO foi realizada de acordo com o protocolo de trizol (TRI) Reagent (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram congeladas e lisadas com TRI Reagent (Sigma, EUA) utilizando 1 mL para cada 10cm² de área superficial do poço, homogeneizando e transferindo o lisado celular para tubos de 1,5mL. Os tubos foram deixados em repouso por cinco minutos para completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Depois desse tempo, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de TRI Reagent utilizado. O tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos e deixado em repouso a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida o tubo foi centrifugado a 12000 G por 15 minutos a 4°C, obtendo ao final da centrifugação uma mistura com 3 fases: uma fase orgânica vermelha contendo proteínas, uma interfase contendo DNA e uma fase superior aquosa contendo o RNA.

A fase contendo o RNA extraído foi transferida para outro tubo e adicionou-se a ela 0,5mL de isopropanol para cada 1mL de TRI Reagent utilizado na primeira etapa. A amostra foi homogeneizada e deixada em repouso à temperatura ambiente por dez minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10000 G por dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ressuscitado em 1mL de álcool etílico 70% para cada 1mL de TRI Reagent utilizado. A amostra foi levada ao vórtex e em seguida centrifugada a 7500 G a 4°C. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e secou brevemente a amostra, onde o sedimento foi ressuscitado em 30 µL de H₂O livre de DNase e RNase. O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro (Jenway Genova Nano 3-in-1) e as amostras foram padronizadas e diluídas na concentração de 100ng/mL.

A partir do RNA das células extraídas foi realizada uma qPCR para avaliar a expressão gênica de marcadores de diferenciação das células dendríticas imaturas

após o tratamento com as NPs. Para o preparo da qPCR, os oligonucleotídeos foram diluídos para 5 μ M com H₂O estéril para os genes CD40, CD86, IFN-beta e GAPDH (Tabela 1). A detecção e quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando a tecnologia de SYBR GREEN e o kit Go Taq Probeq PCR Master Mix. Para tal, foi realizada a adição de 5 μ L do SYBR GREEN diluído 100 vezes com o 24,5 μ L do CRX + Go Taq Probe qPCR Master Mix. Para uma reação foi utilizado 5 μ L do Master Mix + CRX + SYBR GREEN; 0,2 μ L de Go Script RT-Mix; 0,5 μ L de cada oligonucleotídeos; 1,8 μ L de H₂O estéril e 2,5 μ L de RNA diluídos em 100ng/mL. Foi montada a placa de acordo com o mapa, inserido no aparelho Step One™, ajustados os ciclos e realizada a qPCR conforme instrução do fabricante. Todas as amostras foram lidas em duplicata. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bullet in #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). O controle endógeno utilizado foi o GAPDH.

Quadro 1 - Genes alvo e oligonucleotídeos utilizados.

Gene	Oligonucleotídeos		Referências
	Senso (5'–3')	Antisenso (3'–5')	
CD86	CATGGGCTTGGCAATCCTTA	AAATGGGCACGGCAGATATG	Li et al., 2016
GAPDH	CGTGTTCCCTACCCCAATGT	TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT	Li et al., 2016
CD40	GTTTAAAGTCCCGGATGCGA	CTCAAGGCTATGCTGTCTGT	Laribee & Klemz, 2001
IFN- β	CCAGCTCCAAGAAAGGACGA	CGCCCTGTAGGTGAGGTTGAT	Lang et al., 2017

Fonte: Do autor.

4.8 Processamento histológico da pele

O fragmento de pele utilizado na análise histopatológica foi fixado em formol tamponado (pH 7,2) a 10% durante 24h, desidratado em etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina histológica (NOVAES *et al.*, 2016). Para cada fragmento de

pele, foram obtidos 4 cortes semi-seriados com 5µm de espessura, os quais foram coletados em intervalos de 100µm para evitar analisar a mesma área histológica. As seções histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica geral (GONÇALVES *et al.*, 2013, 2014). Os cortes foram montados sobre lâmina histológica e visualizados em microscópio de campo claro com lente objetiva de 40x (AxioScope A1, Carl Zeiss, Alemanha). Imagens histológicas digitais foram obtidas utilizando-se câmera fotográfica acoplada ao microscópio (AxioCam, Carl Zeiss, Germany). Para cada animal, foram obtidas seis imagens (três da pele e três da hipoderme) histológicas aleatórias não coincidentes, as quais foram submetidas à análise histopatológica e estereológica.

4.9 Análise histopatológica da pele

A análise histopatológica da pele foi realizada a partir das mesmas imagens histológicas coradas com H&E (DA SILVA *et al.*, 2019). A distribuição da queratina e o infiltrado inflamatório na derme foram avaliados. Para a análise semi-quantitativa da celularidade dérmica, foi adotado sistema de pontuação histopatológica estabelecido por (KIM *et al.*, 2015), o qual foi utilizado para classificar a gravidade dos achados/alterações morfológicas em: 0 = nenhum (normal), 1 = leve, 2 = moderado; 3 = marcante, e 4 = muito marcante. O método de diagrama de campo foi usado para representar os resultados histopatológicos Felizardo *et al.* (2018) de celularidade tecidual. A pele dos tratados com PBS foi utilizada como padrão de normalidade para a caracterização do escore histopatológico. Além da análise semi-quantitativa, também foi determinado o número de células inflamatórias no tecido em 15 campos aleatórios não coincidentes.

4.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas pelo *software* Graph Pad Prism® 4.0 utilizando a análise multivariada de Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn. O nível mínimo de significância aceita será de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização e padronização de nanopartículas

A análise por DLS mostrou que as nanopartículas produzidas nos dois valores de pH testados (5,0 e 7,0) apresentaram resultados discordantes em relação ao tamanho, carga e PDI. Os resultados demonstram que as NPPI produzidas no pH 5,0 apresentaram tamanho de $1144 \pm 385,53$ nm, potencial Zeta de $-23,56 \pm 0,4$ mV e PDI de $0,73 \pm 0,15$ (Tabela 2). Para as NPPI produzidas em pH 7,0, foi detectado um tamanho de $552,96 \pm 39,15$ nm, potencial Zeta de $-37,96 \pm 2,45$ mV e PDI $0,46 \pm 0,08$. A análise estatística indicou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de tamanho médio (nm), potencial Zeta (mV) e PDI entre os diferentes pHs (Tabela 2).

Tabela 1 - Caracterização de nanopartículas de BSA contendo poli (I:C) produzidas em diferentes pHs.

NPPI	Tamanho médio (nm)	potencial Zeta (mV)	PDI
pH 5,0	$1144 \pm 385,53$	$-23,56 \pm 0,4$	$0,73 \pm 0,15$
pH 7,0	$552,96 \pm 39,15$	$-37,96 \pm 2,45$	$0,46 \pm 0,08$

Fonte: Do autor.

Legenda: NPPI: nanopartículas de BSA contendo poli (I:C).
PDI: índice de polidispersão.

Uma vez que as NPPI produzidas em pH 7,0 tiveram um menor tamanho e menor índice de PDI, todos os experimentos realizados a partir de então foram feitos com esse pH. A tabela 3 apresenta a comparação do tamanho, carga e PDI das NPPI em relação às NPVs. Os dados demonstram que as NPPI possuem tamanhos maiores e carga mais negativa. Não há diferença significativa de PDI entre os dois tipos de nanopartículas produzidas. A morfologia das NPPI foi analisada através de Microscopia de Força Atômica (AFM – Park Systems NX10) e as análises indicam a que essas possuem forma esférica (Figura 2).

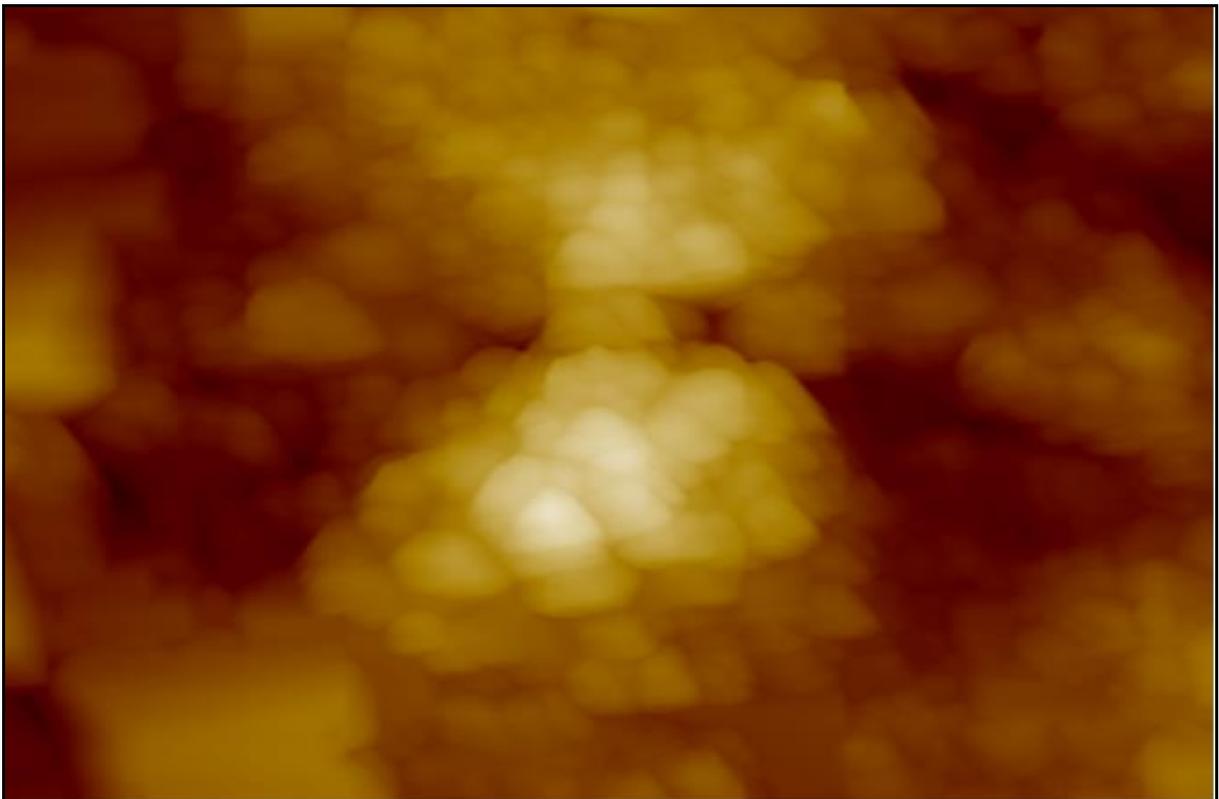
Tabela 2 - Tamanho, carga e PDI das Nanopartículas utilizadas nesse estudo.

NPs	Tamanho (nm)	Carga (mV)	PDI
NPPI	497±140,4	-33,66±3,93	0,38±0,06
NPVs	268,7±103,3	-28,3±0,56	0,37±0,01

Fonte: Do autor.

Legenda: NPPI: nanopartículas de BSA contendo poli (I:C).
NPVs: nanopartículas vazias.

Figura 2 - Microscopia de Força Atômica de nanopartículas de BSA contendo poli (I:C).

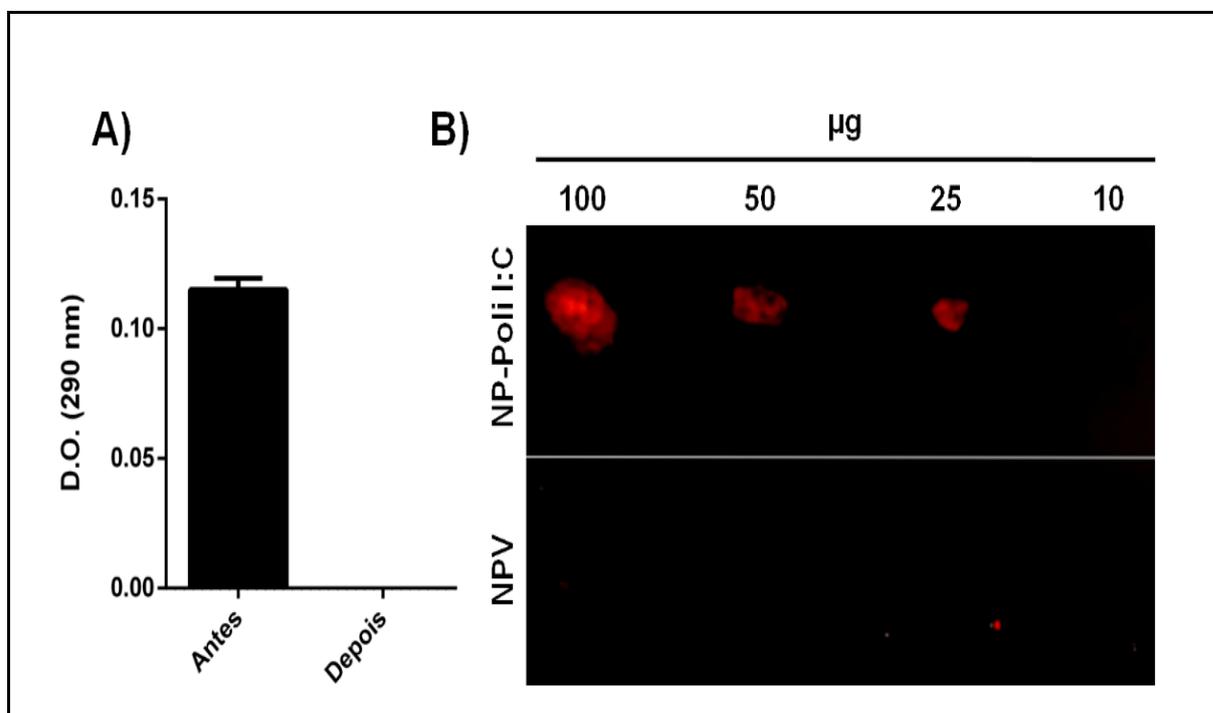


Fonte: Do autor.

Para determinar a taxa de encapsulamento de poli (I:C) das nanopartículas, foi realizada a leitura de densidade ótica (D.O) por espectrofotometria a 290nm do sobrenadante antes e depois da produção das nanopartículas, conforme descrito no item 4.3 da metodologia. O resultado indica que houve um encapsulamento do poli (I:C) nas nanopartículas, pois não houve a detecção de nenhum valor de D.O no sobrenadante obtido após a formação das NPs (Figura 3a). Para confirmar a presença de poli (I:C) nas nanopartículas, essas foram aplicadas em gel de agarose 1,5x, na presença de um intercalante de ácido nucléico fluorescente em luz

ultravioleta (Gel Red). Conforme observado na figura 3b, somente as NPPI apresentaram sinal fluorescente.

Figura 3 - Avaliação do encapsulamento de poli (I:C) nas nanopartículas de BSA.



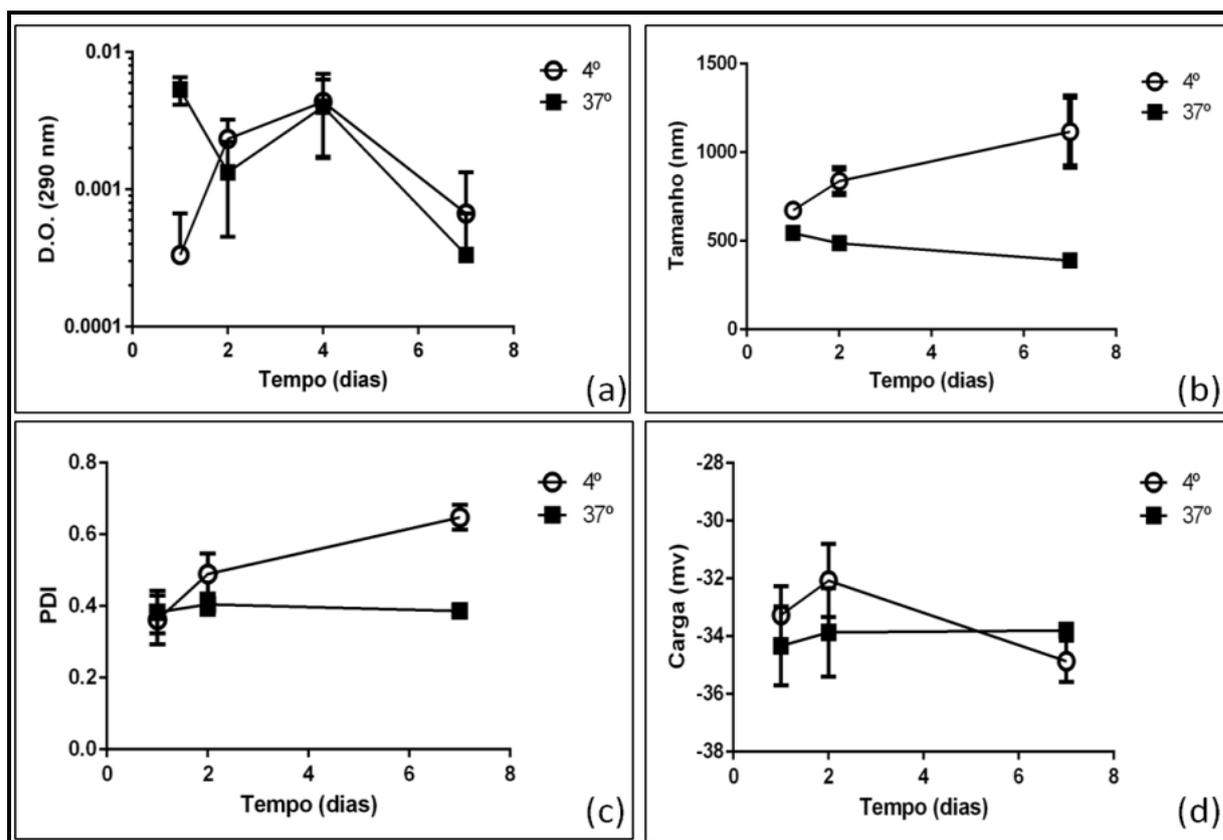
Fonte: Do autor.

Legenda: A) Quantificação por espectrofotometria a 290nm dos sobrenadantes coletados antes e após a formação das NPs. O gráfico representa o resultado de três experimentos independentes. B) Gel de agarose 1,5% onde foram adicionadas concentrações de NPPI e NPVs.

Para verificar a estabilidade da NPPI em diferentes temperaturas, estas foram incubadas a 4°C e 37°C por 1, 2, 4 e 7 dias. O primeiro parâmetro a ser analisado foi a quantificação de poli (I:C) no sobrenadante das nanopartículas após a incubação. Após o tempo de incubação, as nanopartículas foram centrifugadas, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para quantificação de poli (I:C), por espectromorfometria. Os resultados indicam que os valores de densidade de ótica (D.O) foram relativamente baixos, indicando que não houve a liberação de poli (I:C) até o sétimo dia de análise (Figura 4a). Além da taxa de liberação de poli (I:C) no sobrenadante, também foram avaliados o tamanho, o potencial zeta e o índice de polidispersão das nanopartículas incubadas nas condições descritas. Os dados indicam que na temperatura de 4°C ocorre uma agregação das NPPI em tempos

mais prolongados de incubação, pois houve aumento do tamanho e PDI (Figura 4b e 4c). Não houve variação do potencial Zeta das nanopartículas durante o tempo analisado (Figura 4d).

Figura 4 - Teste de estabilidade das nanopartículas contendo poli (I:C) nas temperaturas de 4°C e 37°C.



Fonte: Do autor.

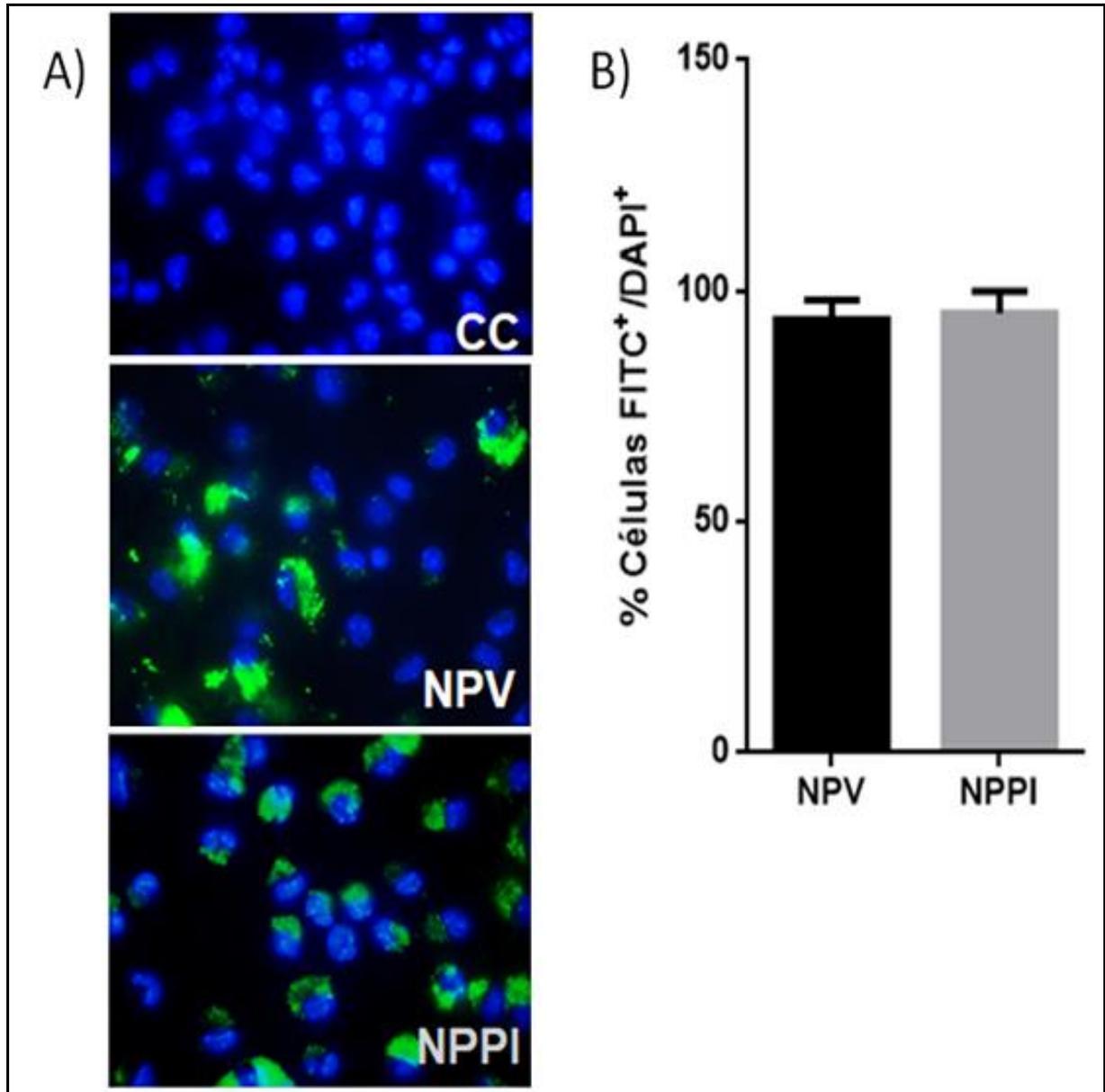
Legenda: As NPs foram incubadas a 4°C e 37°C durante 1, 2, 4 e 7 dias. Após o tempo de incubação, as nanopartículas contendo poli (I:C) foram processadas para quantificação da liberação de poli (I:C) no sobrenadante (a), determinação do tamanho (b), PDI (c) e potencial Zeta (d).

5.2 Caracterização do efeito das nanopartículas de BSA contendo poli (I:C) em células dendríticas derivadas de medula óssea

Após a obtenção das DCsMO, foi avaliada a captura das NPPI por estas células. Após 48 horas, os resultados demonstraram que tanto células tratadas com NPVs quanto NPPI, apresentaram elevada taxa de captura. Obteve-se micrografias,

onde há presença de NPs em verde no interior das células tratadas (Figura 5a). Apresentaram sinal positivo a maioria das células tratadas (Figura 5b).

Figura 5 - Análise da captura de nanopartículas por células dendríticas derivadas da medula óssea.



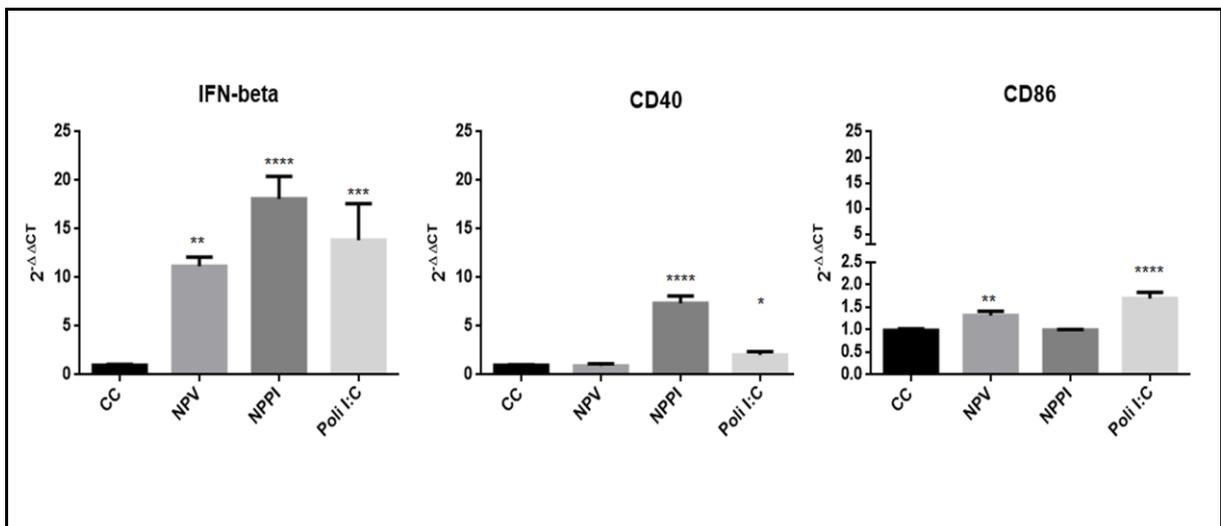
Fonte: Do autor.

Legenda: A) Fotos representativas demonstrando a captura das NPs pelas DCsMO CC: controle de célula; NPVs: nanopartículas vazias; NPPI: nanopartículas de BSA contendo poli (I:C). B) Quantificação das células FITC⁺/DAPI⁺ por Microscopia de fluorescência.

5.3 Efeito do tratamento no fenótipo das células dendríticas derivadas de medula óssea

Para analisar os efeitos de NPPI sobre a diferenciação de células dendríticas foram analisadas a expressão dos genes CD86, CD40 e IFN- β . Conforme apresentado na figura 6 pode-se observar o aumento na expressão de IFN- β e CD40 na presença de NPPI quando comparados ao controle negativo. Houve aumento da expressão de IFN- β e CD86 quando as células foram tratadas com NPVs.

Figura 6 - Análise da expressão gênica de IFN- β , CD40 e CD86 em células dendríticas derivadas da medula óssea tratadas com NPs.



Fonte: Do autor.

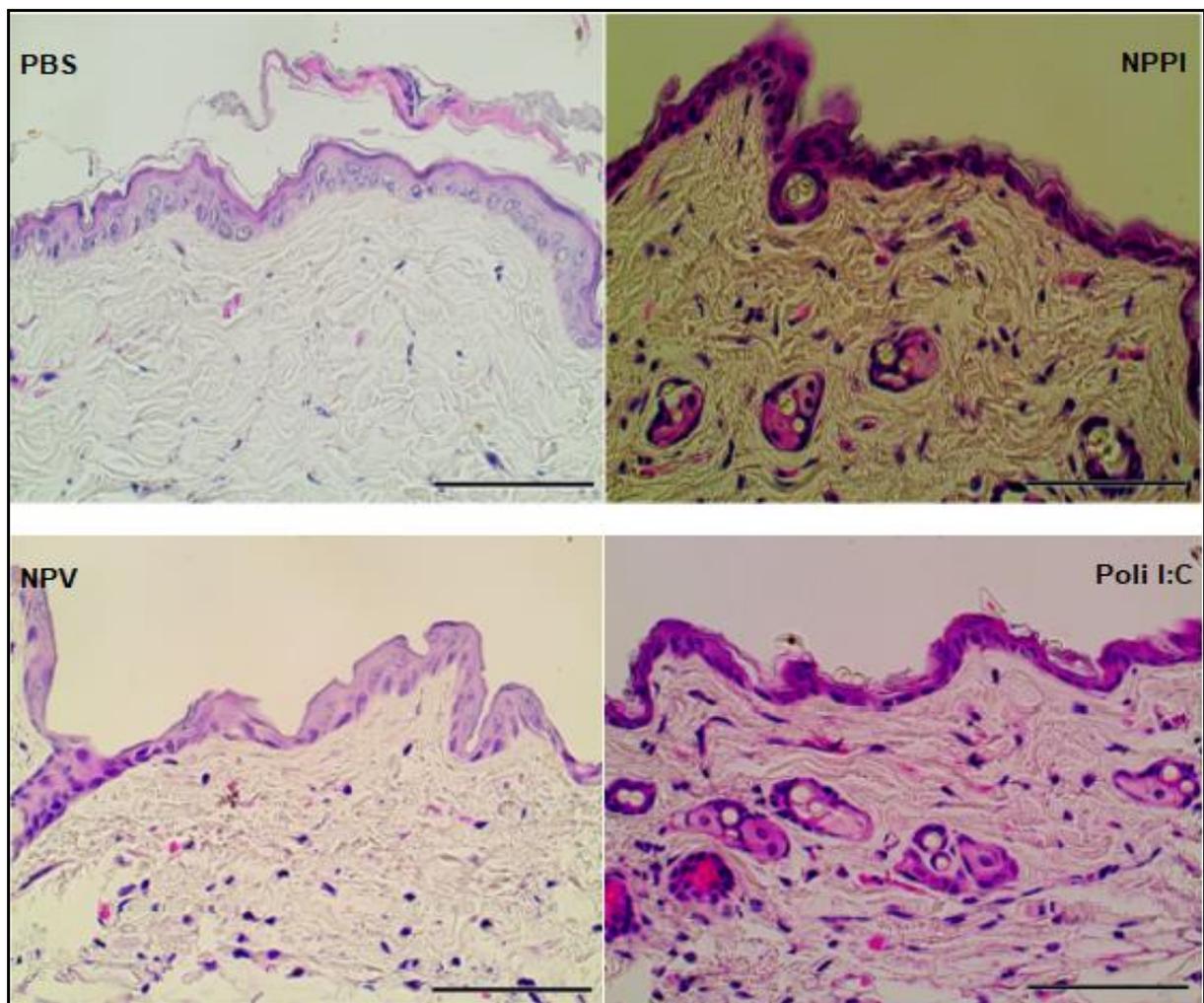
Legenda: CC: controles de células, NPVs: nanopartículas vazias, NPPI: nanopartículas de BSA contendo poli (I:C), poli (I:C): ácido poliinosínico-policitidílico. * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$; *** $p > 0.001$; **** $p > 0.0001$.

5.4 Análise histopatológica

A partir de análise morfológica qualitativa, identificou-se que a pele dos animais tratados com PBS apresentou organização microestrutural típica, com epiderme delgada, queratina frouxa com perfil de descamação evidente. Além disso, esses animais apresentaram aspecto homogêneo da derme, com predomínio de componentes da matriz extracelular conjuntiva e baixa celularidade tecidual. Os animais do grupo NPVs apresentaram áreas epidérmicas livres de queratina, e leve

aumento da celularidade na derme profunda. Os animais dos grupos NPPI e poli (I:C) apresentaram padrão morfológico epidérmico semelhante ao grupo PBS. No entanto, a presença de folículos pilosos e perfis bem definidos de glândulas sebáceas foi evidente na pele dos animais dos grupos NPPI e poli (I:C), a qual também apresentou maior celularidade conjuntiva com distribuição homogênea na derme superficial e profunda, comparado aos grupos PBS e NPVs (Figura 7).

Figura 7 - Imagens microscópicas representativas da pele de camundongos tratados com nanopartículas contendo poli (I:C) (Coloração: hematoxilina e eosina. Aumento 400x).



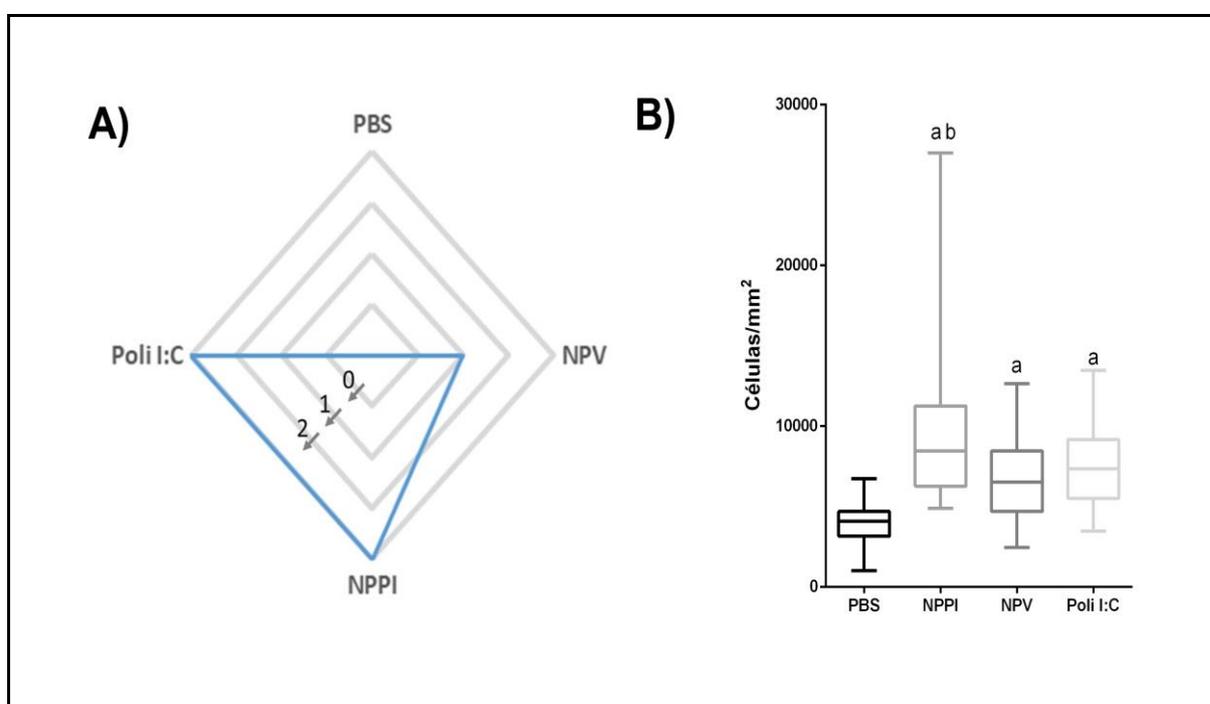
Fonte: Do autor.

Legenda: PBS: tampão fosfato de sódio, NPVs: nanopartículas vazias, NPPI: nanopartículas de BSA contendo poli (I:C), poli (I:C): ácido poliinosínico-policitídílico. Barra: 50 μ m.

A análise histopatológica semiquantitativa integrada de todos os grupos investigados, indicou que os grupos NPPI e poli (I:C) apresentaram celularidade similar, e efeito proporcional sobre escore histopatológico de celularidade tecidual.

Enquanto a pele dos animais do grupo PBS apresentaram classificação normal de celularidade (escore 0), os animais do grupo NPVs apresentaram escore médio 1 (leve aumento da celularidade dérmica), e os animais de ambos os grupos NPPI e poli (I:C) apresentaram escore médio 2 (aumento moderado da celularidade dérmica) (Figura 8a). Já na contagem de células no tecido analisado foi possível observar um aumento significativo da celularidade em todos os grupos tratados com nanopartículas (NPPI, NPVs) e no grupo inoculado com poli (I:C) (Figura 8b).

Figura 8 - Celularidade dérmica na pele de camundongos tratados com nanopartículas de BSA contendo poli (I:C).



Fonte: Do autor.

Legenda: A) Diagrama de campo com a categorização semi-quantitativa da celularidade dérmica na pele de camundongos. Sem alteração, 1: aumento leve, 2: aumento moderado. A linha contínua azul representa a influência simultânea dos grupos sobre o escore histopatológico. A linha apresenta maior deslocamento em direção aos grupos com maior efeito sobre o escore histopatológico (NPPI e poli (I:C)). B) Total de células por mm² no tecido dérmico de camundongos. ^a: indica significância de $p < 0,001$ em relação ao grupo PBS; ^b: indica significância de $P < 0,01$ em relação ao grupo NPV e poli (I:C). PBS: tampão fosfato de sódio, NPV: nanopartículas vazias, NPPI: nanopartículas de BSA contendo poli (I:C), poli (I:C): ácido poliinosínico-policitidílico.

6 DISCUSSÃO

As NPs utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de BSA através do método de co-acervação. Depois da preparação, as NPs foram caracterizadas fisicamente. As análises de AFM demonstraram que as NPPI apresentaram formato esférico, o que já era esperado, visto que outros trabalhos que prepararam NPs por meio da coacervação, também obtiveram partículas esféricas (DA SILVA *et al.*, 2019; MORAES *et al.*, 2018).

A determinação do tamanho e da carga de NPs são parâmetros de controle de qualidade críticos para caracterizar adequadamente a formulação de uma nanopartícula (ALKIE *et al.*, 2019). NPVs apresentam um tamanho que varia geralmente de 50 a 300nm (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). Porém, alguns estudos demonstram que NPs preparadas a partir de BSA ou HSA, podem apresentar mais de 500 nm (DREIS *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012). Dessa maneira, os valores de diâmetro médio obtidos neste trabalho estão dentro daqueles encontrados em outros estudos. A variação no tamanho das NPVs, pode ser devido às técnicas utilizadas para o preparo e também às diferentes substâncias associadas às NPs. Desse modo, o tamanho relativamente maior das NPPI comparado com as NPVs, pode ser explicado pela presença de poli (I:C) durante a preparação das NPs.

As NPVs e NPPI produzidas neste estudo apresentaram um potencial Zeta de -28 e -33 mV, respectivamente. A literatura aponta que valores de potencial Zeta acima de ± 30 mV são importantes para uma boa estabilidade físico-química da suspensão. Assim, estas NPs possuem potenciais Zeta que estão próximos ou dentro dos considerados ideais para boa estabilidade do sistema coloidal (MOHANRAJ; CHEN, 2006; SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). Os diferentes valores de potencial Zeta encontrados para as duas formulações, podem ser explicados pela presença do poli (I:C), sendo que esse apresenta carga negativa e pode assim influenciar o potencial Zeta final das NPPI.

Os valores de índice de polidispersão, que mede a distribuição de tamanho das partículas, obtidos para as NPVs e NPPI foram de $0,37 \pm 0,06$ e $0,38 \pm 0,06$, respectivamente. Verifica-se que as NPVs apresentaram índice de polidispersão $< 0,3$, indicando a formação de NPs com tamanhos homogêneos (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

A taxa de encapsulamento do poli (I:C) nas nanopartículas foi alta, pois não houve a detecção de nenhum valor de D.O referente à presença de poli (I:C) no sobrenadante obtido após a formação das NPs (Figura 3a). Esse dado é similar ao obtido em outros estudos que utilizaram nanopartículas híbridas de lipossoma e sílica e nanopartículas de quitosana que obtiveram taxas de encapsulamento do poli (I:C) de 86,1% e 88,7% respectivamente (COLAPICCHIONI *et al.*, 2015; SPETH *et al.*, 2017).

No presente estudo foi observada uma boa estabilidade de NPPI a 37°C, pois mesmo após vários dias de incubação os valores de D.O detectados no sobrenadante foram relativamente baixos, indicando que não houve liberação de poli (I:C) até o sétimo dia de análise (Figura 3a). Na temperatura de 4°C ocorreu uma agregação de NPPI em tempos mais estendidos de incubação, ocorrendo aumento do tamanho e PDI (Figura 4b). Esse fato pode ser observado pela tendência de agregação BSA a temperaturas baixas (HONDA *et al.*, 2000).

O tratamento das DCs com as NPPI não induziu citotoxicidade e as células foram capazes de capturar as NPs (Figura 5). As DCsMO de camundongos são consideradas DCs imaturas. Esse tipo celular possui ampla capacidade fagocítica e portanto, a elevada taxa de captura das nanopartículas produzidas nesse trabalho pelas DCs pode ser atribuída pela ampla capacidade fagocítica dessas células. Além disso, é possível que receptores de albumina possam estar envolvidos no processo de internalização das nanopartículas utilizadas. O receptor Fc neonatal é um dos receptores de reconhecimento da albumina e é expresso em variados tipos celulares, incluindo as APCs, endotélio vascular, intestino, pulmões, rins e barreira hematoencefálica (ROOPENIAN; AKILESH, 2007). Dessa forma, a ligação das nanopartículas de albumina a esse receptor pode também contribuir para a elevada taxa de internalização das NPs observada.

Apesar de expressarem moléculas de MHC de classe I e de classe II, as DCs imaturas são inábeis, no que diz respeito à geração de complexos peptídeo-MHC na membrana plasmática. Além disso, as DCs imaturas secretam poucas citocinas imunoestimuladoras e possuem baixos níveis de expressão de moléculas coestimulatórias (TROMBETTA; MELLMAN, 2013; HAMMER; MA, 2013). De acordo com a Figura 6, observou-se o aumento na expressão de IFN- β e CD40 na presença de NPPI em comparação ao controle negativo. Também foi possível observar aumento da expressão de IFN- β e CD86 quando as DCs foram tratadas com NPVs.

O IFN- β é uma citocina que pertence à classe dos interferons (IFNs) do tipo I e que foi inicialmente conhecido por possuir atividade antiviral (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004). Os IFNs do tipo I são produzidos após o reconhecimento de PAMPs por receptores presentes na membrana ou nos compartimentos citosólicos (endossomos e lisossomos). Os receptores do tipo *toll* (TLRs) são capazes de reconhecer várias moléculas de origem microbiana e dentre essas podemos citar o lipopolissacarídeo bacteriano e o dsRNA viral (KAWAI, 2011). O ácido poliinosínico-policitidílico poli (I:C) é um análogo de RNA viral dupla fita (dsRNA) e é considerado um indutor da maturação de DCs, por possuir a capacidade de se ligar ao receptor TLR-3 e estimular a produção de proteínas co-estimulatórias e secreção de citocinas antivirais, tais como os IFNs do tipo I (VERDIJK *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2002; ROUAS *et al.*, 2004). Assim sendo, a secreção de IFN- β em células tratadas com NPPI indica que pode haver o reconhecimento do poli (I:C) presente na matriz da nanopartícula pelo TLR-3. Outro fato interessante é que NPVs foram também capazes de induzir a expressão de IFN- β em DCs tratadas por essas NPs. Isso indica que pode haver uma via de indução da expressão de IFN- β independente do reconhecimento de poli (I:C).

A diferenciação de DCs imaturas em maduras pode ser desencadeada por IFNs do tipo I (α ou β) através da ligação do tipo dessas citocinas ao receptor celular para esses IFNs. Após esse estímulo é observado um aumento da expressão de vários genes que são importantes para a função efetora das DCs maduras. Observa-se, portanto, após o tratamento de DCs imaturas com IFN- β ou outro interferon do tipo I, um aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias importantes no processo de apresentação de antígenos e ativação de células T, tais como o CD40 e CD86 (LUFT, 1998; MA; CLARK, 2009; BARTHOLOME *et al.*, 1999; HUSSIEN *et al.*, 2001). Ambas as moléculas possuem papel importante na estimulação e ativação de células T (MOSER; MURPHY, 2000; GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Alguns trabalhos já demonstraram que o tratamento de DCs imaturas com poli (I:C) resulta na produção de DCs com alta expressão das moléculas co-estimulatórias, CD80, CD86 e CD40 (VERDIJK *et al.*, 1999; UEHATA; TAKEUCHI, 2020). Portanto, o aumento da expressão de IFN- β e CD40 por DCs tratadas com NPPI indica um potencial efeito adjuvante dessas NPs. Apesar de não ter sido detectado um aumento na expressão de CD86 nas células tratadas com NPPI, não podemos

descartar que esse aumento da expressão possa ocorrer em tempos mais tardios (após 48 horas).

Após verificar o efeito das nanopartículas sobre a expressão de marcadores de diferenciação em DCs *in vitro*, foram realizadas análises histopatológicas *in vivo* utilizando camundongos C57BL/6 inoculados pela via subcutânea com as nanopartículas produzidas. Após inoculação dessas pela via subcutânea, observou-se resposta diferenciada entre os animais do grupo controle (PBS) dos animais que receberam NPVs e NPPI. Os animais do grupo NPVs apresentaram áreas epidérmicas livres de queratina, e leve aumento da celularidade (infiltrado inflamatório) na derme profunda enquanto os animais dos grupos NPPI e poli (I:C), apresentaram padrão morfológico epidérmico semelhante ao grupo PBS e aumento moderado da celularidade dérmica. Esse efeito foi semelhante ao observado no estudo de Silva *et al.* (2018), que demonstrou o recrutamento de células inflamatórias na pele após a administração de NPs contendo BSA. Juntos esses dados corroboram para estabelecer o papel pró-inflamatório de NPs contendo BSA e reforçar o uso dessas NPs como sistema de entrega de antígeno e potenciais adjuvantes. Neste estudo foi possível verificar um aumento da presença de um infiltrado inflamatório na derme nos animais inoculados com NPPI em relação aos NPVs (Figuras 7 e 8). Esse fato pode ser devido à presença de poli (I:C) nas NPPI, as quais podem ser reconhecidas por células da imunidade inata presentes na pele.

Na parte basal da epiderme é encontrado um subtipo especializado de DCs, denominadas células de Langerhans (LCs). Essas estão localizadas na camada epidérmica e formam a primeira linha de APCs capazes de localizar antígenos invasores da pele. Vários estudos indicam um papel essencial para as LCs na indução de respostas de células T muito provavelmente pela sua capacidade de apresentação de antígenos de forma cruzada para células T *naive* ou de memória (VAN DER BURG *et al.*, 2019). As DCs dérmicas foram identificadas como alicerce na indução de respostas imunológicas bem como infecção cutânea e em vacinação cutânea (DURAI; MURPHY, 2016).

7 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, verifica-se que o tratamento de DCs com NPPI induz um aumento da expressão de IFN- β e CD40. Além disso, observa-se um aumento infiltrado inflamatório na derme de animais inoculados com essa formulação. Dessa forma, NPs contendo BSA associadas a poli (I:C) em sua formulação podem ser bons candidatos vacinais, uma vez que podemos ter um efeito adjuvante e estimulador da imunidade.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783–801, 2006.

ALKIE, T. N. *et al.* Enhancing innate antiviral immune responses in rainbow trout by double stranded RnA delivered with cationic phytoglycogen nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 13619, p. 1-12, 2019.

AN, F-F.; ZHANG, X-H. Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. **Theranostics**, v. 7, p. 3667-3689, 2017.

APOSTÓLICO, J. S. *et al.* Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. **Journal of Immunology Research**, v. 16, p. 1-16, 2016.

AWATE, S.; BABIUK L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-10, 2013.

AZMI, F. *et al.* Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 3, p. 778-796, 2014.

BARTHOLOME, E. J. *et al.* IFN-beta interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: Selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, p. 471-478, 1999.

BOLTJES, A.; van WIJK, F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-13, 2014.

BRENCICOVA, E.; DIEBOLD, S. S. Nucleic acids and endosomal pattern recognition: How to tell friend from foe? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-14, 2013.

CHONG, C. S. *et al.* Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 85-99, 2005.

CHOW, E. K. H.; HO, D. Cancer nanomedicine: From drug delivery to imaging. **Science Translational Medicine**, v. 5, p. 1-12, 2013.

COLAPICCHIONI, V. *et al.* Killing cancer cells using nanotechnology: novel poly(I:C) loaded liposome-silica hybrid nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 1-11, 2015.

CORREIA-PINTO, J. F.; CSABA, N.; ALONSO, M. J. Vaccine delivery carriers: insights and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 27-38, 2012.

DA SILVA, C. G. *et al.* Effective chemoimmunotherapy by co-delivery of doxorubicin and immunological adjuvants in biodegradable nanoparticles. **Theranostics**, v. 9, p. 6485-6500, 2019.

DEMENTO, S. L. *et al.* Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 294-306, 2011.

DEMENTO, S. L. *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. **Biomaterials**, v. 33, p. 4957-4964, 2012.

DEMENTO, S. L. *et al.* TLR9- targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. **The Journal of Immunology**, v. 185 p. 2989-2997, 2010.

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 19-30, 2010.

DREIS, S. *et al.* Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 207-214, 2007.

DURAI, V.; MURPHY, K. M. Functions of murine dendritic cells. **Immunity**, v. 45, p. 719-736, 2016.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 157, p. 168-182, 2012.

FELIZARDO, A. A. *et al.* Impact of *Trypanosoma cruzi* infection on nitric oxide synthase and arginase expression and activity in young and elderly mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 129, p. 227-236, 2018.

FRANCHI, L. *et al.* Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological Reviews**, v. 227, p. 106–128, 2008.

GELAMO, E. L. *et al.* Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1594, p. 84-99, 2002.

GIL-TORREGROSA, B. C. *et al.* Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. **European Journal of Immunology**, v. 34, p. 398–407, 2004.

GOMES, A. C.; MOHSEN, M.; BACHMANN, M. F. Harnessing nanoparticles for immunomodulation and vaccines. **Vaccines**, v. 5, p. 1-15, 2017.

GONÇALVES, R. V. *et al.* Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of *Brassica oleracea* on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. **Pathology – Research and Practice**, v. 209, p. 648-653, 2013.

GONÇALVES, R. V. *et al.* Bathysa cuspidata extract modulates the morphological reorganization of the scar tissue and accelerates skin wound healing in rats: a time-dependent study. **Cells Tissues Organs**, v. 199, p. 266-277, 2014.

GONDAN, A. I. B. *et al.* Effective cancer immunotherapy in mice by polyIC-imiquimod complexes and engineered magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 170, p. 95-115, 2018.

GREGORY, A. E.; TITBALL, R.; WILLIAMSON, D. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2013.

GUERMONPREZ, P. *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Reviews of Immunology**, v. 20, p. 621-667, 2002.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 505-517, 2007.

HAMDY, S. *et al.* Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. **Vaccine** v. 26, p. 5046–5057, 2008.

HAMMER, G. E.; MA, A. Molecular control of state dendritic cell maturation and immuno homeostasis. **Annual Reviews of Immunology**, v. 31, p. 743-791, 2013.

HONDA, C. *et al.* Studies on Thermal Aggregation of BSA as a Drug Carrier. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, p. 464-466, 2000.

HU, Y. *et al.* Synergy of TLR3 and 7 ligands significantly enhances function of DCs to present inactivated PRRSV antigen through TRIF/MyD88-NF- κ B signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23977, p.1-15, 2016.

HUSSIEN, Y. *et al.* Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 121, p. 102-110, 2001.

JEWELL, C. M.; LÓPEZ, S. C. B.; IRVINE, D. J. In situ engineering of the lymph node microenvironment via intranodal injection of adjuvant-releasing polymer particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 15745–50, 2011.

JIN, B. *et al.* Immunomodulatory effects of dsRNA and its potential as vaccine adjuvant. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-17, 2010.

JOFFRE, O. *et al.* Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, p. 234-247, 2009.

JOSHI, V. B.; GEARY, S. M.; SALEM, A. K. Biodegradable particles as vaccine antigen delivery systems for stimulating cellular immune responses. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 12, p.2584–2590, 2013.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, p. 637-50, 2011.

KHEIROLLAHPOUR, M. *et al.* Nanoparticles and vaccine development. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, p. 6-21, 2020.

KIM, H.; GRIFFITH, T. S.; PANYAM, J. Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles as a vaccine delivery platform for TLR7/8 agonist-based cancer vaccine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 370, p. 715-724, 2019.

KOUCHAKZADEH, H. *et al.* Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, p. 1206-1211, 2010.

KOUCHAKZADEH, H.; SAFAVI, M.S.; SHOJAOSADATI, S. A. Efficient Delivery of Therapeutic Agents by Using Targeted Albumin Nanoparticles. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 98, p. 121-143, 2015.

KRYCZEK, I. *et al.* CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. **Cancer Research**, v. 65, p. 465-472, 2005.

LANG, X. *et al.* TRIM65-catalized ubiquitination is essential for MDA5-mediated antiviral innate immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, p. 459-473, 2017.

LARIBEE, R. N.; KLEMSZ, M. J. Loss of PU.1 Expression Following Inhibition of Histone Deacetylases. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 5160-5166, 2001.

LEE, A. W. *et al.* A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. **Vaccine**, v. 20, p. 8-22, 2002.

LEHMANN, C. E. *et al.* Adolescent vaccination strategies: interventions to increase coverage. **Paediatric Drugs**, v. 18, p. 273-285, 2016.

LEVINE, M. M.; SZTEIN, M. B. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. **Nature Immunology**, v. 5, p. 460-464, 2004.

LI, J. G. *et al.* CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, p. 878-884, 2016.

LIMA, F. A. *et al.* Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. **Vaccine**, v. 31, p. 2465-2470, 2013.

LONGHI, M. P. *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, p. 1589-1602, 2009.

LUFT, T. *et al.* Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 1947-53, 1998.

LYNN, G. M. *et al.* In vivo characterization of the physicochemical properties of polymer-linked TLR agonists that enhance vaccine immunogenicity. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 1201-1210, 2015.

MA, D.Y.; CLARK, E. A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Seminars in Immunology**, v.21, p.265-272, 2009. **Erratum in: Seminars in Immunology**, v. 22, p. 190, 2010.

MACRI, C. *et al.* Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, p. 1-8, 2016.

MAHLA, R. S. *et al.* Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 248, p. 1-16, 2013.

MBOW, M. L. *et al.* New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 411-416, 2010.

MOHAMUD, R. *et al.* The effects of engineered nanoparticles on pulmonary immune homeostasis. **Drug Metabolism Reviews**, v. 46, p. 176-190, 2014.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – a Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 561-573, 2006.

MORAES, S. M. S. *et al.* Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **Vaccine**, v. 36, p. 6408-6415, 2018.

MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. **Nature Immunology**, v. 1, p. 199-205, 2000.

MULLER, E. *et al.* Both type I and type II Interferons can activate antitumor M1 macrophages when combined with TLR stimulation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2520, p. 1-16, 2018.

NEMBRINI, C. S. A. *et al.* Nanoparticle conjugation of antigen enhances cytotoxic T-cell responses in pulmonary vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 989-997, 2011.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química nova**, v. 34, p. 408-413, 2011.

NOVAES, R. D. *et al.* Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuates cardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy. **Life Sciences**, v. 152, p. 210-219, 2016.

PALCHETTI, S. *et al.* Transfected poly(I:C) activates different dsRNA receptors, leading to apoptosis or immunoadjuvant response in androgen-independent prostate cancer cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, p. 5470-5483, 2015.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, p. 221-233, 2009.

PARK, K. Albumin: a versatile carrier for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 1, p. 1, 2012.

PATI, R.; SHEVTSOV, M.; SONAWANE, A. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-16, 2018.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 8-32, 2004.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, p. 1597-1608, 2013.

RODRIGUES, N.F. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Vaccine**, v. 31, p. 5062-5066, 2013.

ROOPENIAN D. C.; AKILESH, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 715-725, 2007.

ROUAS R. *et al.* Poly(I:C) used for human dendritic cell maturation preserves their ability to secondarily secrete bioactive IL-12. **International Immunology**, v. 16, p. 767-773, 2004.

SAHDEV, P.; OCHYL, L. J.; MOON, J. J. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 2563-2582, 2014.

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

SEPULVEDA-TOEPFER, J. A. *et al.* TLR9-mediated activation of dendritic cells by CD32 targeting for the generation of highly immunostimulatory vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 15, p. 179-188, 2019.

SHAKYA, A. K.; NANDAKUMAR, K.S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 10, p. 1-16, 2013.

SILVA, E. F. *et al.* A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 13, p. 1-5, 2012.

SILVA, M. M. P. *et al.* The use of nanoparticles in wound treatment: a systematic review. **Revista da Escola de Enfermagem Da USP**, v. 51, p. 1-9, 2017.

SILVA, N. I. O. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles induce histopathological changes and inflammatory cell recruitment in the skin of treated mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1311-1317, 2018.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER JR., J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 592-605, 2013.

SOKOLOVA, V. *et al.* Delivery of the TLR ligand poly(I:C) to liver cells in vitro and in vivo by calcium phosphate nanoparticles leads to a pronounced immunostimulation. **Acta Biomaterialia**, v. 64, p. 401-410, 2017.

SPETH, M. T. *et al.* Poly(I:C)-encapsulating nanoparticles enhance innate immune responses to the tuberculosis vaccine Bacille-Calmette-Guérin (BCG) via synergistic activation of innate immune receptors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, p. 4098-4112, 2017.

STAHL-HENNIG, C. *et al.* Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. 1-15, 2009.

SWIECKI, M.; COLONNA, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 471-485, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TROMBETTA, E. S.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 975-1028, 2005.

UEHATA, T.; TAKEUCHI, O. RNA Recognition and Immunity—Innate Immune Sensing and Its Posttranscriptional Regulation Mechanisms. **Cells**, v. 9, p. 1-21, 2020.

VAN DER BURG, N. M. D. *et al.* A low inflammatory, Langerhans cell-targeted microprojection patch to deliver ovalbumin to the epidermis of mouse skin. **Journal of Controlled Release**, v. 302, p. 190-200, 2019.

VERDIJK, R. M. *et al.* Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly (I:C)] induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 57-61, 1999.

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 2012.

VIJAYAN, V. *et al.* Recent advances in nanovaccines using biomimetic immunomodulatory materials. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, p. 1–27, 2019.

WEISSIG, V.; PETTINGER, T. K.; MURDOCK, N. Nanopharmaceuticals (Part 1): products on the market. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, n. 9, p. 4357-4373, 2014.

YADAV, H. K. S. *et al.* Nanovaccines formulation and applications-a review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 380-387, 2018.

ZAMAN, M.; GOOD, M. F.; TOTH, I. Nanovaccines and their mode of action. **Methods**, v. 60, n. 3, p. 226-231, 2013.

ZHAO, D. *et al.* Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folatedecorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 669-677, 2010.

ZU, Y. *et al.* Optimization of the preparation process of vinblastine sulfate (VBLS) – loaded folate conjugated bovine serum albumin (BSA) nanoparticles for tumortargeted drug delivery using response surface methodology (RSM). **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 321-333, 2009.

APÊNDICE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG



Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina sobre células dendríticas e construção de um protótipo vacinal para prevenção da infecção por Zika virus**, registrada com o nº **0009/2020**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Leomil Coelho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/06/2020 a 31/12/2021**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/6	30	0	30	Central unifal-mg

Alfenas, 05 de Novembro de 2020

Prof(a). Dr(a). Leonardo Augusto de Almeida

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG