



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

ANIELLE CARVALHO BANDEIRA

Nanopartículas Poliméricas e Interações com Macrófagos

**Goiânia
2016**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: **Anielle Carvalho Bandeira**

Título do trabalho: **Nanopartículas Poliméricas e Interações com Macrófagos**

3. Informações de acesso ao documento:


Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Falecido

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do orientador²

Data: 08/10/2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

- Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente
 - Submissão de artigo em revista científica
 - Publicação como capítulo de livro
 - Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

ANIELLE CARVALHO BANDEIRA

Nanopartículas Poliméricas e Interações com Macrófagos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás para
obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral

**Goiânia
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Carvalho Bandeira, Anielle
Nanopartículas Poliméricas e Interações com Macrófagos
[manuscrito] / Anielle Carvalho Bandeira. - 2016.
xi, 69 f.

Orientador: Prof. Dr. André Corrêa Amaral .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. nanopartículas. 2. quitosana. 3. macrófagos. 4. PLGA. 5. fagocitose. I. , André Corrêa Amaral, orient. II. Título.

CDU 576.8

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus, por sua misericórdia e providência em minha vida, por sempre me proteger e me orientar. Agradeço também a Nossa Senhora, Santa Rita de Cassia e a todos os anjos e santos por me ajudarem a superar todas as dificuldades, especialmente no mestrado.

À minha amada família: minha mãe Eleuza, meu pai Irineu, minha irmã Ângelica e meu priminho Pedro Henrique por todo amor, compreensão e incentivo.

Ao meu orientador, Professor Dr. André Corrêa Amaral, por ter me orientado na realização deste estudo.

À Professora Adriana de Moraes C. Crespo por ter me ajudado em várias etapas desta dissertação.

À Professora Dra. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola pelas sugestões e pela doação dos macrófagos.

À Professora Dra. Emília Lima, do Laboratório de Química da Universidade Federal de Goiás pela doação das nanopartículas magnéticas.

À Keili do laboratório (LANAB) por toda colaboração. Agradeço também a todos do LANAB que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desta dissertação, em especial, a Adelaide, Amanda e Bruna.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	viii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Sistemas nanoestruturados	3
1.3 Nanopartículas poliméricas	5
1.3.1 Quitosana	7
1.3.2 Ácido poli (lático-co-glicólico) – PLGA	9
1.3.3 Nanopartículas magnéticas	11
1.4 Caracterização das nanopartículas	13
1.4.1 Morfologia	14
1.4.1 Diâmetro e índice de polidispersão	14
1.4.2 Potencial zeta	15
1.5 Reconhecimento das nanopartículas pelo sistema imune	15
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 Preparação e caracterização das nanopartículas	24
4.1.1 Preparação de nanopartículas de quitosana	24
4.1.2 Preparação de nanopartículas de poli (lático-co-glicólico) – PLGA	24
4.1.3 Nanopartículas magnéticas	25
4.1.5 Caracterização das nanopartículas	26
4.1.5.1 Diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta	26
4.1.5.2 Análise da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão	26
4.1.6.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	26
4.2 Ensaio <i>in vitro</i>	26
4.2.1 Macrófagos RAW 264.7	26
4.2.2 Avaliação de citotoxicidade em macrófagos	27

4.2.3	Análise da fagocitose de nanopartículas de quitosana contendo magnética por microscopia eletrônica de transmissão	28
4.2.3	Cultura de macrófagos com nanopartículas para dosagem de citocinas ...	29
4.3	Ensaio <i>in vivo</i>	29
4.3.1	Grupos experimentais	30
4.3.2	Dosagem das citocinas IFN- γ e IL4	30
4.3.3	Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos	31
4.4	Dosagem de citocinas pela técnica de ELISA	31
5	RESULTADOS	33
5.1	Caracterização das nanopartículas de quitosana e de poli(láctico-co-glicólico, PLGA) vazias e nanopartículas de quitosana contendo magnéticas.....	33
5.1.2	Morfologia das nanopartículas	34
5.2	Ensaio <i>in vitro</i>	39
5.2.1	Citotoxicidade das nanopartículas	39
5.2.2	Fagocitose de nanopartículas de quitosana por macrófagos.....	40
5.2.3	Produção de citocinas em cultura de macrófagos.....	42
4.2	Ensaio <i>in vivo</i>	44
5.3.1	Influência das nanopartículas de quitosana na modulação <i>in vivo</i> da produção de IFN- γ e IL-4	44
5.3.1.1	Dosagem de IFN- γ e IL-4 no soro	44
5.3.1.2	Dosagem de IFN- γ e IL-4 na cultura de esplenócitos	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS	69
	Anexo 1 – Parecer da comissão de ética no uso de animais (CEUA)	69

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1 - Tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta de nanopartículas de quitosana e de PLGA vazias e de quitosana contendo magnética.....	35
Tabela 2- Concentrações de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante da cultura de macrófagos.....	44
Tabela 3 - Concentrações de IL12p40 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de macrófagos.....	44
Tabela 4 - Concentrações de IL-10 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de macrófagos.....	45
Tabela 5 - Concentrações das citocinas IFN- γ e IL-4 (pg/mL) no soro de camundongos após 24horas e 7 dias da injeção de nanopartículas de quitosana.....	46
Tabela 6 - Concentrações de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais após diferentes estímulos.....	47
Tabela 7 - Concentrações de IL-4 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais após diferentes estímulos.....	48
Figura 1 - Alguns tipos de sistemas nanoestruturados: (a) nanopartículas poliméricas; (b) nanopartículas lipídicas sólidas; (c) lipossomas; (d) nanocristais ou pontos quânticos; (e) nanotubos de carbono; (f) dendrímeros; (g) magnéticas.....	4
Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	5
Figura 3 - Obtenção da quitosana através da desacetilação da quitina.....	7
Figura 4 - Reticulação iônica entre o TPP e a quitosana.....	9
Figura 5 – Síntese de poli (lático-co-glicólico) - PLGA.....	10
Figura 6 - Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas.....	12
Figura 7 - Determinantes de interação de nanopartículas com as células.....	18
Figura 8 - Nanopartículas com hidrofobicidade diferente.....	19

Figura 9 - Esquematização dos ensaios <i>in vivo</i> para avaliar a resposta imune.....	31
Figura 10 - (A) Distribuição de tamanho de nanopartículas de quitosana, (B) nanopartículas de PLGA, (C) nanopartículas de quitosana contendo magnética.....	35
Figura 11 - Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de PLGA.....	36
Figura 12 - (A) Nanopartículas de quitosana; (B) Amostra das nanopartículas de quitosana com o contraste Fosfotúngstico; (C) Amostra das nanopartículas de quitosana com o contraste Tetróxido de Ósmio.....	36
Figura 13 - Micrografias TEM de nanopartículas (A) magnéticas e (B) quitosana magnética.....	38
Figura 14 - Micrografia HRTEM de nanopartículas de quitosana magnética preparadas pelo método de gelificação iônica. (A) A camada de quitosana envolvendo as magnéticas (setas); (B) A linha amarela delimita a região cristalina de uma única nanopartícula.....	39
Figura 15 - Espectro de EDS de micrografia de nanopartículas de quitosana contendo magnética.....	39
Figura 16 – Efeitos das nanopartículas de Quitosana e de PLGA na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7.....	40
Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de quitosana magnética internalizadas por macrófagos. (A) Macrófagos controle; (B) 2 horas de incubação de nanopartículas de quitosana magnética; (C e D) 4 horas de incubação; (E e F) 24 horas de incubação.....	42
Figura 18 - Espectroscopia de Energia Dispersiva EDS das nanopartículas de quitosana contendo magnéticas incubadas com os macrófagos.....	43
ANEXO 1 - Parecer da comissão de ética no uso de animais (CEUA).....	72

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA _ Análise de Variância
Ch/ γ -PGA _ quitosana/ γ -ácido glutâmico
DLS _ Espalhamento dinâmico de luz (*Dinamic Light Scattering*)
DMSO _ Dimetilsulfóxido
EDS _ Espectroscopia de Energia Dispersiva
HRTEM _ Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução
IFN- γ _ Interferon gama
IL _ Interleucina
LANAB _ Laboratório de Nano&Biotecnologia
LPS _ lipopolissacarídeo
MET _ Microscopia Eletrônica de transmissão
MTT _ 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm _ Nanômetro
NO _ Oxido Nítrico
NQ _ Nanopartículas de quitosana
PBS _ Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*)
PDI _ Índice de polidispersão (*Polydispersion index*)
PEG _ Polietileno glicol
PGA _ Ácido Glicólico
PHA _ Fitohemaglutinina
PLA _ Ácido Lático
PLGA _ poli(lático-co- glicólico)
PVA _ *Poli-vinil pirrolidona*
QM _ Quitosana magnética
RPMI _ *Roswell Park Memorial Institute*
SFB _ Soro fetal Bovino
Th _ Linfócitos T auxiliar (*T helper*)
TNF- α _ Fator de Necrose Tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)
TPP _ Tripolifosfato de sódio

RESUMO

A nanotecnologia envolve a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria na escala manométrica. Apresenta impactos positivos na medicina que envolve desde o diagnóstico ao tratamento de doenças. Sistemas de entrega de fármacos apresentam a capacidade de superar barreiras biológicas e otimizar a liberação de um fármaco. No entanto, um dos principais desafios na utilização desses sistemas é a sua internalização pelos macrófagos. Esse estudo objetiva preparar e caracterizar nanopartículas poliméricas formadas por polímeros biodegradáveis e investigar o seu impacto na função dos macrófagos *in vitro* através da observação da viabilidade celular, atividade fagocítica e produção de citocinas. Além do perfil de citocinas no soro e sobrenadante de cultura de esplenócitos provenientes de camundongos Balb/C que foram injetados com uma suspensão de nanopartículas de quitosana. As nanopartículas de quitosana e quitosana contendo magnéticas foram preparadas por gelificação iônica apresentando morfologia reticular e “quase esférica”, respectivamente, e potencial zeta positivo. As de PLGA preparadas por emulsificação e evaporação do solvente apresentaram morfologia esférica e potencial zeta negativo. Todas apresentaram diâmetro menor que 300 nanômetros e índice de polidispersão menor que 0,5. As nanopartículas de quitosana e de PLGA afetaram a viabilidade de macrófagos *in vitro* apenas na maior concentração testada (4mg/mL). As nanopartículas de quitosana contendo magnética foram internalizadas pelos macrófagos em 4h e 24h de incubação. As diferentes nanopartículas desencadearam a produção elevada de TNF- α e baixa produção de IL12p40 e IL-10. No soro e no sobrenadante da cultura de esplenócitos foi observada tanto a produção de INF- γ quanto de IL-4. No entanto, a produção de IL-4 foi maior que a de IFN- γ .

Palavras chave: nanopartículas; quitosana; PLGA; nanopartículas magnéticas; macrófagos; MET; fagocitose.

ABSTRACT

Nanotechnology involves the creation and use of materials, devices and systems through control of matter on the nanometer scale. It has positive impact on medicine involving the treatment and diagnosis. Drug delivery systems prepared with nanostructures have the ability to overcome biological barriers and optimizing drug release. However, one of the main challenges in the use of these systems is their internalization by macrophages. This study aims to prepare and characterize polymer nanoparticles formed by biodegradable polymers and investigate its impact on the function of macrophages *in vitro* by the observation of cell viability, phagocytic activity and cytokine production. Also, was investigate the cytokine profile in serum and splenocytes culture supernatant from Balb/C mice injected with chitosan nanoparticles. The chitosan and chitosan-containing magnetic nanoparticles were prepared by ionic gelation crosslinking, resulting in a morphology "nearly spherical" and positive zeta potential. The PLGA prepared by emulsification and solvent evaporation method presented spherical morphology and negative zeta potential. All preparations had a diameter smaller than 300 nanometers and polydispersity index lower than 0.5. Nanoparticles of chitosan and PLGA affected the viability of macrophages *in vitro* only at the highest concentration tested (4 mg/mL). The chitosan nanoparticles containing magnetic nanoparticles were internalized by macrophages after 4h and 24h of incubation. Different nanoparticles triggered high production of TNF- α and low IL12p40 production and IL-10. Serum and splenocytes culture supernatant was observed in both the production of IFN- γ as IL-4. However, IL-4 production was higher than that of IFN- γ .

Keywords: nanoparticles; chitosan; PLGA; magnetic nanoparticles; macrophages; phagocytosis; TEM.

1 INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Considerações Gerais

Nanotecnologia envolve a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas por meio do controle da matéria na escala nanométrica, ou seja, a bilionésima parte de um metro (Jain, 2008). Ela não é em si, uma ciência isolada, mas sim uma união de outras áreas do conhecimento, tais como química, física e biologia. Trata-se de um campo multidisciplinar de rápido crescimento com potencial para aplicações que vão desde a ciência básica às áreas médicas especializadas (Nahar et al. 2006).

A aplicação da nanotecnologia na área da saúde, que envolve desde o diagnóstico ao tratamento de doenças, é chamada de nanomedicina e contribui com muitos impactos positivos na qualidade de vida das pessoas. Podem ser citadas aplicações de sistemas nanoestruturados contendo anticorpos ligados às nanopartículas magnéticas para rastrear tumores com maior precisão do que os métodos convencionais (Felipe & Amaral, 2008). Para o tratamento ou a prevenção de doenças, estão disponibilizadas formulações medicamentosas nanoestruturadas para a liberação controlada e entrega de fármacos em alvos específicos no organismo. Também são usadas para a veiculação de antígenos para aplicações em vacinas (Moghimi et al. 2005).

O uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de sistemas para a entrega de princípios ativos, os quais podem ser fármacos ou outras biomoléculas, tem como finalidade a concepção de carreadores capazes de serem alvo-específicos. São capazes também de aumentar a estabilidade de algumas biomoléculas tais como peptídeos e ácidos nucleicos e, devido ao tamanho reduzido do sistema carreador, melhorar a sua absorção. Além disto, tais sistemas podem ser preparados para promover a liberação controlada ou sustentada e que sejam capazes de entregar o fármaco no local de ação pretendido reduzindo assim, a quantidade de efeitos colaterais indesejáveis resultantes da terapia convencional (Santos-Magalhães et al. 2000).

A incorporação de um fármaco em um sistema nanoestruturado pode modificar a sua taxa de absorção, a concentração plasmática e a sua distribuição no organismo (Moghimi et al. 2005). Dependendo do tipo de material usado para preparar as

nanopartículas é possível também aumentar a solubilidade e estabilidade de alguns fármacos. Além disso, esses sistemas apresentam a capacidade de encapsular uma variedade de agentes terapêuticos, tais como pequenas moléculas hidrofílicas e/ ou hidrofóbicas, peptídeos, medicamentos à base de proteínas e ácidos nucleicos (Alexis et al. 2010).

Alguns tipos de sistemas nanoestruturados são capazes de atravessar barreiras biológicas e, quando usadas em formulações incorporando fármacos, podem promover a sua liberação em locais específicos, aumentando assim a sua eficácia (Alexis et al. 2008). Entretanto, uma preocupação ao serem desenvolvidas nanoformulações para a veiculação de princípios ativos, principalmente àqueles administrados pela via endovenosa, é a sua rápida eliminação da circulação sanguínea reduzindo, assim, a eficácia terapêutica (Zahr et al. 2006). Isto é, na maioria das vezes, resultado da interação dos sistemas nanoestruturados com biomoléculas presentes no plasma que sinalizam às células do sistema imunológico como estranhas ao organismo e que devem ser eliminadas. O processo de internalização das nanopartículas pelos macrófagos pode ser facilitado pela opsonização, , que é a adsorção de proteínas plasmáticas à superfície da nanopartícula (Dobrovolskaia et al. 2008).

A rápida internalização pode ser problemática quando se é necessária a circulação prolongada de sistemas nanoestruturados carregados de fármacos (Chellat et al. 2005). Para se contornar este problema, modificações ou a funcionalização de superfície das nanoestruturas, podem reduzir ou impedir o processo de opsonização, possibilitando o direcionamento e acúmulo destas nanoestruturas em locais específicos, podendo levar ao aumento do tempo de circulação no sangue, protegendo contra a sua inativação e eliminação prematuras (Kim et al. 2010).

A resposta imune desencadeada pelas nanopartículas é pouco abordada na maioria dos estudos relacionados com a aplicação da nanotecnologia na área médica (Roberts et al. 2013). Apesar dos sistemas nanoestruturados terem se mostrado importantes ferramentas biotecnológicas torna-se necessária a compreensão das interações biológicas das nanopartículas com moléculas do organismo (Dobrovolskaia et al. 2008).

O reconhecimento de sistemas nanoestruturados como substâncias estranhas pelas células imunes pode ser uma questão ambígua. A interação pode conduzir a uma resposta imunitária sobre as nanopartículas de modo a serem inativadas ou rapidamente degradadas, acarretando falha ou diminuição da eficácia terapêutica. Já em algumas situações, a interação entre um sistema nanoestruturado e o sistema imune é considerada

desejável como em casos de formulações carreadoras de vacinas ou de fármacos para o tratamento de doenças causadas por patógenos intracelulares (Zolnik et al. 2010).

Assim, é importante se entender o comportamento dos sistemas nanoestruturados preparados com diferentes tipos de materiais em relação à sua captura pelas células de defesa. Isto é importante para se desenvolver uma formulação que seja eficiente para carrear um princípio ativo de forma eficiente e segura, aumentando assim a eficácia terapêutica.

1.2 Sistemas nanoestruturados

Formulações desenvolvidas usando-se os princípios da nanotecnologia podem ser chamadas de sistemas nanoestruturados. Tendo em vista que a nanotecnologia tem o objetivo de manipular estruturas com tamanhos extremamente reduzidos, é possível a criação de sistemas nanoestruturados capazes de carrear princípios ativos de diferentes naturezas (Caruthers et al. 2007). Esses sistemas surgiram como ferramentas poderosas para a entrega de fármacos e como agentes de diagnóstico, devido ao seu tamanho, aos métodos de preparação simples e à possibilidade de modificação da sua superfície para serem alvo direcionados em aplicações *in vivo* (Vasir et al. 2005; Yih & Al-Fandi, 2006).

Sistemas nanoestruturados podem ser adaptados para transportar agentes terapêuticos e para protegê-los contra a degradação hidrolítica ou enzimática, proporcionar o ambiente adequado para a solubilidade e liberação do fármaco. Além disso, eles podem ser funcionalizados com componentes tais como anticorpos, peptídeos, proteínas, açúcares, aptâmeros (sequências de DNA e RNA), para ajudar na sua entrega aos órgãos alvo, tecidos e compartimentos subcelulares (Elsabahy & Wooley, 2013).

Estas formulações quando usadas para a entrega de fármacos têm como finalidade melhorar ou facilitar a ação de compostos terapêuticos, podendo proporcionar a quantidade certa do princípio ativo no local de ação, a fim de maximizar a resposta terapêutica desejada, reduzindo assim a dose necessária e, possivelmente, minimizando os efeitos secundários indesejados (Hillery et al. 2001). Tais propriedades podem colaborar para aumentar a adesão ao tratamento e, conseqüentemente, a qualidade de vida do paciente (Owens & Peppas, 2006).

Algumas das vantagens de se usar os sistemas nanoestruturados incluem manter os níveis plasmáticos do princípio ativo em concentrações constantes; liberação

progressiva e controlada do que se deseja carrear pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura); diminuição expressiva da toxicidade de fármacos muito tóxicos pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima; possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade); diminuição de dose terapêutica e do número de administrações (Pimentel et al. 2007).

A seleção do material para a preparação desses sistemas dependerá da finalidade para o qual o sistema deverá ser usado (Ganta et al. 2007). Podem ser desenvolvidos a partir de uma variedade de materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo polímeros não-degradáveis, biodegradáveis e fosfolípidios (Moghimi et al. 2005; Couvreur & Vauthier, 2006).

As micelas poliméricas, pontos quânticos, lipossomas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas biodegradáveis são alguns exemplos de sistemas nanoestruturados pesquisados em laboratórios, em fase de desenvolvimento pré-clínico ou já em uso (Figura 1) (Sahay et al. 2010; Kou et al. 2013). Cada um desses nanossistemas possui suas particularidades que variam de acordo com as suas propriedades físico-químicas, tamanho e morfologia (Felipe & Amaral 2008).

As nanoestruturas tem se tornado uma importante área de pesquisa, pois podem ser utilizadas para a entrega de fármacos, proteínas, vacinas, macromoléculas biológicas, podendo ser formuladas para a entrega direcionada para o sistema linfático, cérebro, pulmão, fígado, baço ou podem, ainda, permanecer na circulação por longos períodos de tempo (Hans & Lowman, 2002). As nanopartículas, portanto, têm o potencial de revolucionar uma vasta gama de intervenções terapêuticas e de diagnósticos médicos, tais como diagnóstico por imagem, terapia fototérmica, a entrega de ácidos nucleicos, dispositivos implantáveis, além da entrega de fármacos (Naahidi et al. 2013).

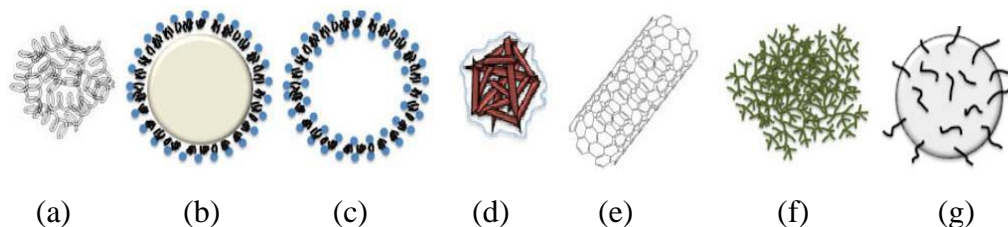


Figura 1 - Alguns tipos de sistemas nanoestruturados: (a) nanopartículas poliméricas; (b) nanopartículas lipídicas sólidas; (c) lipossomas; (d) nanocristais ou pontos quânticos; (e)

nanotubos de carbono e (f) dendrímeros; (g) nanopartículas magnéticas. Fonte: Adaptado de Faraji et al. 2009.

Devido aos estímulos biológicos desencadeados pelas nanopartículas, elas têm atraído interesse como adjuvante nas formulações de vacinas, podendo ser empregadas para induzir respostas imunes desejadas, tanto para efeitos profiláticos e quanto terapêuticos. As nanopartículas podem ser utilizadas quer como sistemas de entrega de antígeno para melhorar o processamento ou para proteger o antígeno da degradação prematura, e também como imunoestimulante para desencadear a resposta imune. Convencionalmente, o uso de nanopartículas como componente nas formulações de vacina baseia-se na associação entre o antígeno e a nanopartícula para obter um efeito adjuvante (Seth et al. 2015). Os adjuvantes são aquelas substâncias capazes de aumentar a resposta imune a um antígeno (Naahidi et al. 2013).

Dentre os diferentes tipos de nanopartículas, merecem destaque as poliméricas pela sua versatilidade de uso, desde a preparação até paraaplicações *in vivo* (Felipe & Amaral 2008).

1.3 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais com diâmetro entre 10 e 1000 nm, nas quais o fármaco pode se encontrar dissolvido, encapsulado, adsorvido ou disperso na matriz polimérica (Singh & Lillard, 2009; Melo et al. 2012). Elas são classificadas em nanoesferas e nanocápsulas (Figura 2), de acordo com a composição e a organização estrutural (Schaffazick et al. 2003). As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo, como pode também estar adsorvido à parede polimérica; as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode ficar adsorvido ou retido (Delie & Blanco-Príeto, 2005; Reis et al. 2006).

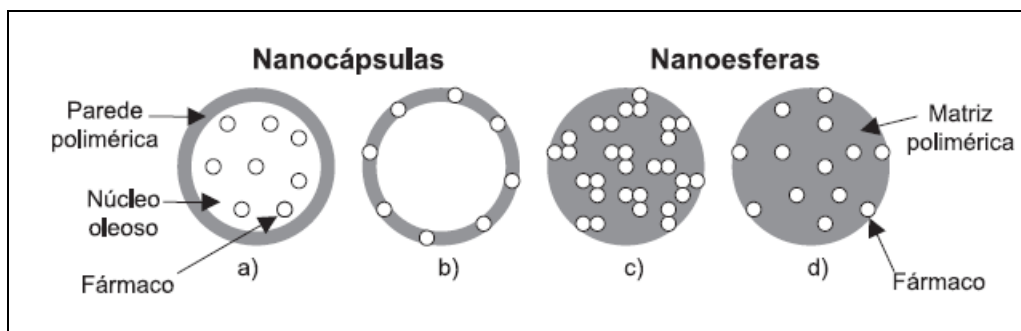


Figura 2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas. Fonte: Schaffazick et al. 2003.

Uma das principais características das nanopartículas poliméricas é promover ação prolongada do fármaco por sua liberação sustentada ou controlada do sistema nanoestruturado (Réus et al. 2009). Podem também proteger fármaco encapsulado da degradação enzimática, possibilitar a entrega direcionada e ter efeitos adjuvantes (Zolnik et al. 2010). São apropriadas para transportar fármacos, peptídeos, antígenos e vacinas de DNA especialmente por serem biodegradáveis e biocompatíveis (Santos-Magalhães et al. 2000).

As nanopartículas poliméricas podem ser formadas por polímeros biodegradáveis tanto de origem sintética, como o copolímero dos ácidos láctico e glicólico [ácido poli (láctico-*co*-glicólico); PLGA] ou natural, como a quitosana (Makadia & Siegel, 2011). Polímeros biodegradáveis, de modo geral, apresentam baixa imunogenicidade e toxicidade, boa biocompatibilidade e biodegradação adequada (Jain 2000). São degradados em moléculas que são metabolizadas e eliminadas do organismo através de vias metabólicas normais (Commandeur et al. 2006). A biodegradação é um termo atribuído à degradação de materiais poliméricos quando aplicados *in vivo*. Ela pode ocorrer pela ação mecânica, enzimática ou por hidrólise (Hillery et al. 2001).

A quitosana tem recebido atenção especial para aplicações nas ciências biológicas, seja na área médica e farmacêutica, por ser um polímero mucoadesivo, imunoestimulante, biodegradável e biocompatível (Prabaharan, 2008; Mohammadpour Dounighi et al. 2012).

1.3.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido pela desacetilação da quitina (Figura 3), o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, ocorrendo também na parede celular de fungos e leveduras (Dash et al. 2011; Pirasa et al. 2014).

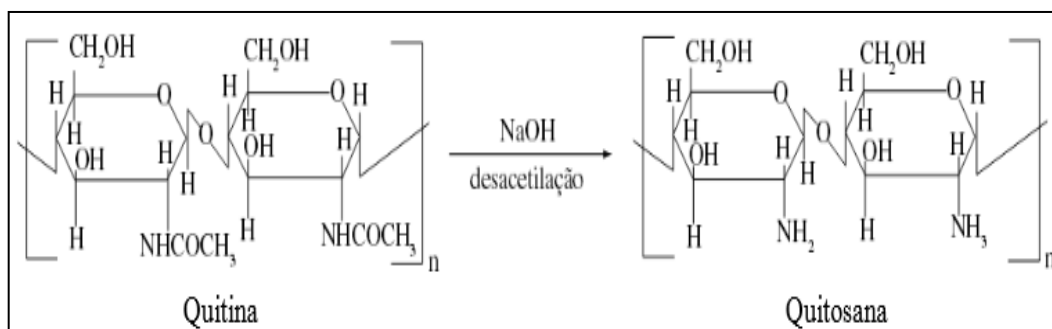


Figura 3 - Obtenção da quitosana através da desacetilação da quitina. Fonte: Spin-neto, 2008.

As estruturas de quitina e quitosana são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β (1-4), porém os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade. Na estrutura da quitina, que é insolúvel na maioria dos solventes, predomina unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose; enquanto que a quitosana é formada predominantemente por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (Azevedo et al. 2007). A quitosana é insolúvel em soluções aquosas básicas e neutras (Shi et al. 2006) e solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos em pH inferior a 6,5 como o ácido acético, fórmico, tartárico e cítrico (Tiyaboonthai, 2003).

A solubilidade da quitosana tem relação com a quantidade de grupos amino passíveis de protonação (NH_3^+) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e, conseqüentemente, maior a solvatação em água (Santos et al. 2003). Assim, o grau de desacetilação é uma importante propriedade química desse polímero, determina a quantidade de grupos amino (NH_2) na cadeia, diferenciando-o da quitina e influenciando a solubilidade, sendo o material

definido como quitosana, quando o grau de desacetilação atingir valores superiores a 75% (Spin Neto, 2008).

Algumas das principais áreas de aplicação da quitosana são na agricultura, tratamento de água, indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica e aplicações biomédicas em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea e liberação sustentada de fármacos em animais e humanos (Rinaudo et al. 2006).

A quitosana apresenta características biofarmacêuticas como sensibilidade ao pH, biocompatibilidade, baixa toxicidade, é metabolizada por certas enzimas, especialmente pela lisozima e é considerada como hidrofílica, biodegradável e biocompatível (Laranjeira & Fávere, 2009). Devido a estas propriedades, o interesse em quitosana e seus derivados como excipientes na entrega de fármacos têm aumentado nos últimos anos. Além disso, esse polissacarídeo natural é catiônico, o que permite-lhe interagir com polímeros carregados negativamente, macromoléculas e poliânions quando em contato em um meio aquoso (Prabaharan, 2008). Outra característica muito atraente da quitosana é a sua mucoadesividade, permitindo assim prolongar o tempo de permanência do fármaco no local de absorção quando aplicado em regiões de mucosa. Este biopolímero é degradado em metabólitos, amino açúcares, que são absorvidos pelo organismo (Agnihotri et al. 2004).

A quitosana é utilizada como excipiente de fármacos solúveis em água para obtenção de uma liberação controlada e sustentada. Além disso, pode ser utilizada como componente de formulações de fármacos pouco solúveis em água com o objetivo de melhorar a sua biodisponibilidade (Severino et al. 2007).

A quitosana apresenta propriedades biológicas como atividade antimicrobiana, efeito coagulante e analgésico, como auxiliar na redução de peso e por acelerar os processos de cicatrização. O seu papel na aceleração da cicatrização de lesões se deve a sua propriedade imunomoduladora, ativando basicamente os macrófagos para o local lesionado. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana, liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia no restabelecimento do colágeno. Eles também liberam *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana em monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (Silva, 2006).

Para o preparo de nanopartículas, a quitosana pode ser reticulada com diferentes substâncias, como o tripolifosfato de sódio (TPP) que é um poliânion não-tóxico, capaz

de interagir com a quitosana para formar redes iônicas reticuladas, com o intuito de reforçar as propriedades mecânicas e estabilidade química da quitosana (George & Abraham, 2006). O TPP é utilizado na preparação de nanopartículas pelo método de gelificação iônica, o qual tem recebido atenção considerável, pois as nanopartículas são obtidas espontaneamente pelas ligações intramoleculares e intermoleculares entre os grupos fosfato do TPP com os grupos amino protonados da quitosana (Figura 4), com a vantagem de não envolver altas temperaturas e solventes orgânicos (Neves et al. 2014).

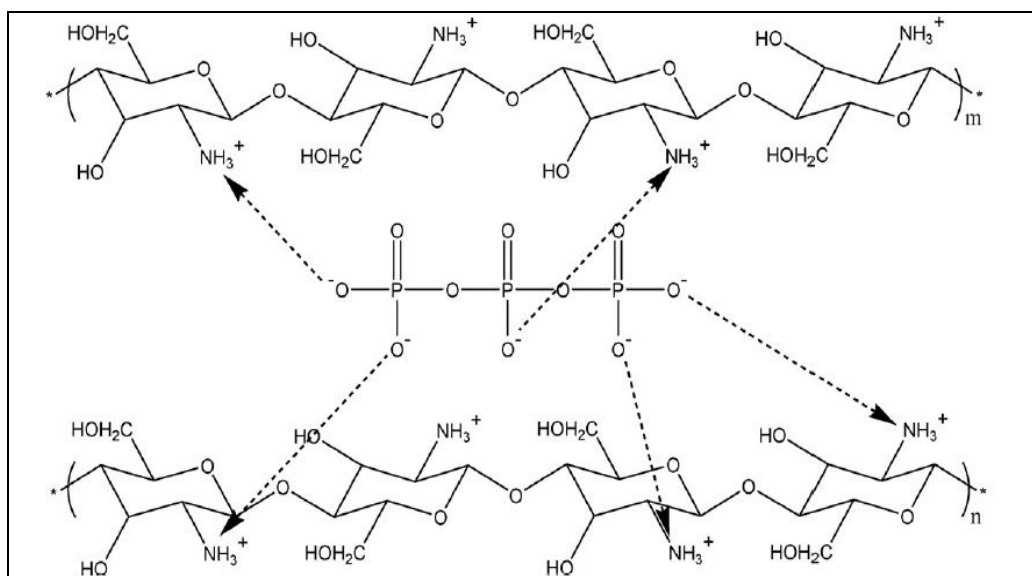


Figura 4 - Reticulação iônica entre o TPP e a quitosana. Fonte: Yang et al. 2007.

O método de gelificação iônica, segundo Janes & Alonso (2003), evidenciou uma elevada afinidade para associar moléculas que possuem cargas negativas. Assim, as nanopartículas de quitosana tornam-se atrativas para o carregamento de moléculas bioativas, protegendo-as da degradação em meio fisiológico.

1.3.2 Ácido poli (lático-co-glicólico) – PLGA

O PLGA têm sido o foco para o desenvolvimento de nanopartículas encapsulando moléculas com ação terapêutica visando a liberação controlada devido às suas vantagens como taxas de liberação prolongada, biocompatibilidade, biodegradabilidade e, principalmente, por ser um co-polímero cujas características físico-químicas estão muito bem descritas (Mundargi 2008).

Este co-polímero (Figura 5) é um poliéster composto por um ou mais de três diferentes monômeros, ácidos láctico (D-PLA, L-PLA) e/ ou ácido glicólico (PGA) (Reis et al. 2006).

O polímero PLA pode existir sob a forma estéreo regular L-PLA, de natureza semicristalina, e a forma óptica inativa racêmica D, L-PLA que é amorfa e permite uma dispersão mais homogênea do fármaco na matriz polimérica. O PGA por sua vez é altamente cristalino, desprovido de grupos laterais metila presentes no PLA (Jain 2000). A escolha da proporção de PLA e PGA formando o PLGA que será usado na preparação das nanopartículas deve levar em consideração, principalmente, o tempo de biodegradação das mesmas, uma vez que uma maior proporção de PLA tende a aumentar consideravelmente o tempo de degradação das nanopartículas (Hillery et al. 2001).

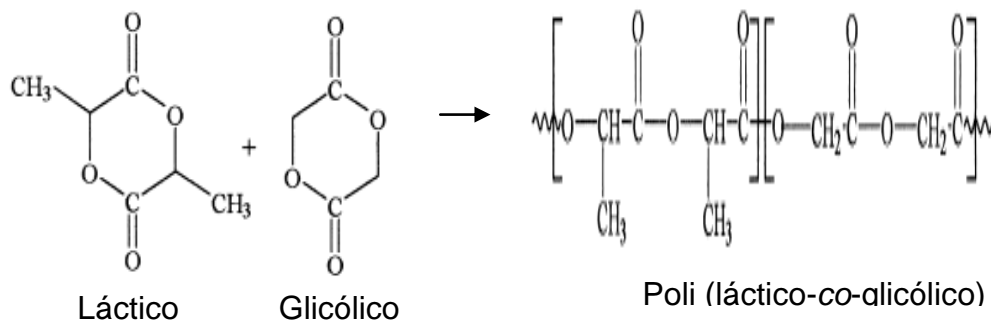


Figura 5: Formação química do poli (láctico-co-glicólico) – PLGA pela ligação entre o ácido láctico (PLA) e o ácido glicólico (PGA). Fonte: Middleton & Tipton, 2000.

As massas moleculares, o grau de cristalinidade, hidrofobicidade/ hidrofiliidade e absorção de água são afetadas pelas variações de proporções de ácido láctico e ácido glicólico (Hillery et al. 2001). O PLA é mais hidrofóbico do que o PGA devido à presença de grupos metila e, portanto, os copolímeros de PLGA ricos em PLA são menos hidrofílicos, absorvem menos água e degradam mais lentamente (Makadia & Siegel 2011).

O PLGA é hidrolisado em monômeros de ácido láctico e de ácido glicólico, que são metabólitos normais e bem tolerados pelo corpo humano (Hamdy et al. 2011). Dessa forma, PLGA se apresenta altamente biocompatível e a toxicidade sistêmica associada ao seu uso é mínima. O ácido láctico entra no ciclo do ácido tricarbóxico sendo metabolizado e, subsequentemente, eliminado do corpo, como dióxido de carbono e água.

O ácido glicólico além de poder entrar no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, assim como o ácido láctico, também pode ser excretado diretamente pela urina (Motta & Duek, 2006).

Em muitas aplicações, é importante se conhecer o comportamento das nanopartículas poliméricas, como por exemplo, o processo de fagocitose pelas células de defesa. Para isso pode ser utilizada a microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Ambas as tecnologias requerem que as nanopartículas possuam propriedades de fluorescência, a fim de serem detectadas intracelularmente após serem fagocitadas pelos macrófagos. Para isto, as nanopartículas devem ser marcadas com sondas fluorescentes (Al-Hallak et al. 2011). Outra possibilidade é a utilização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) que pode detectar estruturas muito menores do que as observadas pela luz visível (Panariti et al. 2012). Embora, MET não possa proporcionar uma medida quantitativa da internalização celular, esse método demonstra a importância da visualização da distribuição das partículas em um nível celular e subcelular (Lorenz et al. 2006).

Com a finalidade de marcar as nanopartículas poliméricas para possibilitar a sua visualização por MET, podem ser usadas as nanopartículas magnéticas como marcadores ou sensores biológicos (Varadan et al. 2008). Estudos mostram que nanopartículas de magnetita podem ser aplicadas diretamente para o processo de marcação celular (Min et al. 2011).

1.3.3 Nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas são materiais nanoestruturados que apresentam uma resposta a um campo magnético aplicado (Issa et al. 2013). Ao sofrer a influência do campo magnético, os componentes ativos ligados ou incorporados nestas partículas podem ser transportados com êxito ao local desejado com precisão relativamente alta, mínima intervenção cirúrgica, dose máxima e evitando efeitos secundários tóxicos em outros órgãos (Shi et al. 2012).

As nanopartículas magnéticas desempenham um papel cada vez mais importante na ciência e tecnologia. Uma vez que elas apresentam baixa toxicidade e são biodegradáveis, desde que em pequenas quantidades, podem ser amplamente utilizadas em biologia e medicina para geração de imagem, rastreamento de células, entrega de

fármacos e siRNA, hipertermia, separação magnética e em bio e quimio-sensores (Chekina et al. 2011).

As nanopartículas magnéticas oferecem possibilidades de aplicação na área biomédica (Figura 6). Isto porque, esses materiais apresentam tamanho na extensão de dezenas de nanômetros, o que significa que eles podem se aproximar dos mais diversos tipos celulares e tecidos interesse com maior precisão. As nanopartículas magnéticas também podem responder a uma variação magnética em função do tempo, o que conduz a um efeito de transferência de energia do campo magnético excitante para as nanopartículas (Pankhurst et al. 2003).

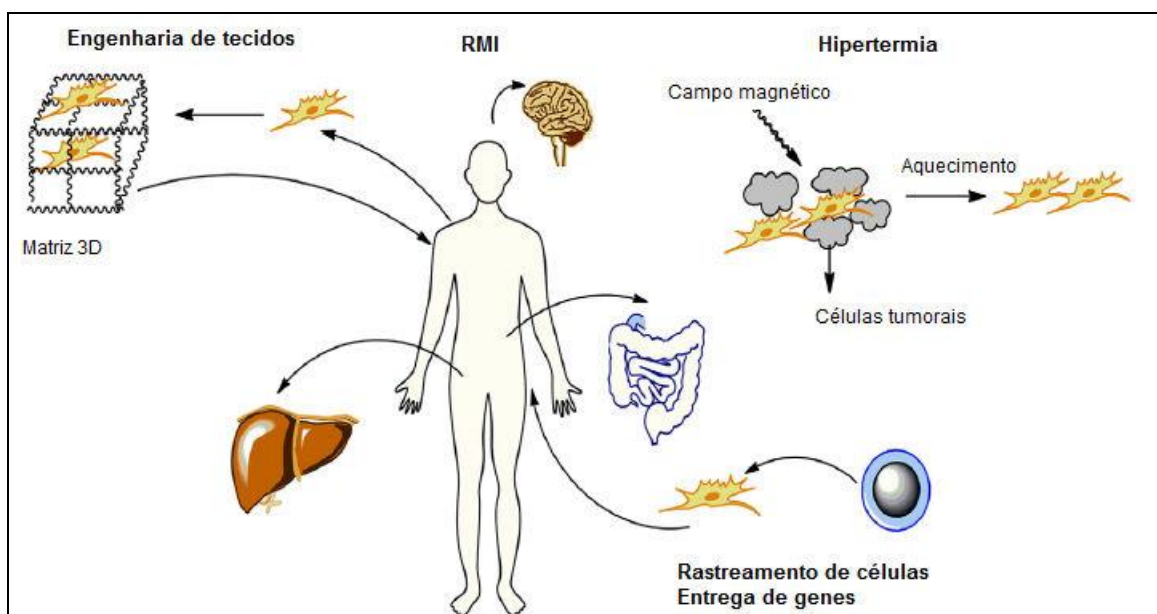


Figura 6 - Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. Fonte: Dias et al. 2011

Existe uma variedade de materiais com propriedades magnéticas disponíveis para a produção de nanopartículas magnéticas, porém, muitos desses materiais, tais como o cobalto, o níquel, e de neodímio-ferro-boro podem ser susceptíveis à oxidação, ou seja, são tóxicos para aplicações *in vivo*. No entanto, os materiais a base de óxido de ferro, tais como magnetita (Fe_3O_4) e maguemita ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$) são relativamente mais seguros e por isto, muito usados para a preparação de nanopartículas magnéticas (Vatta et al. 2006).

As nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 e Fe_2O_3) são consideradas atraentes devido às suas características multifuncionais, incluindo o pequeno tamanho, supermagnetismo e baixa toxicidade (Wu et al. 2009). Além da biocompatibilidade e a facilidade de síntese e subsequente revestimento e funcionalização (Dias et al. 2011).

Dentre estas ferritas a maguemita apresenta vantagem adicional em relação à magnetita por possuírem ferro em um estado oxidado (Fe^{3+}), o que implica em menor toxicidade, ocasionando menos danos ao organismo (McBain et al. 2008).

Apesar de as nanopartículas de óxido de ferro serem relativamente menos tóxicas que as produzidas a partir de outros metais, ainda há preocupações sobre os seus efeitos no organismo, pois elas podem afetar a funcionalidade de células normais, em vez de serem apenas carreadoras. No entanto, o revestimento dessas nanopartículas com substâncias biocompatíveis e hidrofílicas possibilitam uma menor citotoxicidade (Lin et al. 2010).

As nanopartículas são muitas vezes revestidas com um material selecionado seja para torná-las estáveis e biocompatíveis em fluidos fisiológicos ou para proporcionar uma superfície modificada que pode ser utilizada para posterior funcionalização ou ainda para alterar as propriedades magnéticas do núcleo de nanopartículas de forma favorável (Kolhatkar et al. 2013). Os revestimentos influenciam não apenas a estabilidade coloidal, mas também a funcionalidade e o destino biológico das nanopartículas magnéticas. Além disso, podem inibir a corrosão e oxidação do núcleo magnético, impedir a adsorção não-específica de proteínas em meio biológico, prover grupos reativos para a complexação de fármacos e direcionamento de moléculas e controlar interações interfaciais “nano-bio” (Tombácz et al. 2015)

As nanopartículas de óxido de ferro podem ser eficientemente revestidas com vários tipos de modificadores químicos, incluindo polímeros, dendrímeros, ácidos orgânicos, matrizes inorgânicas e polissacárideos (Li et al. 2012). Dentre eles destaca-se a quitosana devido às suas excelentes propriedades como ser hidrófila, biocompatível, biodegradável e apresentar baixa toxicidade. Além disso, esse polímero é conhecido para facilitar a entrega de fármacos através de barreiras celulares (Ge et al. 2009).

O desenvolvimento de nanopartículas magnéticas tem sido acelerado na última década pelos avanços na nanotecnologia. Formulações dessas nanopartículas estão sendo desenvolvidas para diagnosticar e tratar doenças para as quais a terapia convencional tem demonstrado uma eficácia limitada, uma vez que apresentam o potencial de fornecer novas oportunidades para detecção precoce de câncer e terapias direcionadas. Assim, esta tecnologia não só irá minimizar procedimentos invasivos, mas também reduzir os efeitos colaterais a tecidos saudáveis (Sun et al. 2008).

1.4 Caracterização das nanopartículas

A caracterização das nanopartículas pode ser realizada usando diferentes parâmetros, tais como análise de morfologia, diâmetro e distribuição de tamanho (PDI) e potencial zeta (ζ) (Schaffazick et al. 2003).

1.4.1 Morfologia

A análise da morfologia das nanopartículas pode ser realizada por microscopia eletrônica. Dentre as técnicas de microscopia, a eletrônica de transmissão (MET) permite a obtenção de imagens diretas das nanopartículas. MET é capaz de exibir imagens a uma resolução muito maior em comparação aos outros tipos de microscópios. A imagem formada é uma projeção bidimensional da amostra (Domingo & Saurina, 2012).

1.4.1 Diâmetro e índice de polidispersão

O diâmetro e o índice de polidispersão (PDI - *Polydispersion index*) podem ser determinados por diferentes técnicas, como espalhamento dinâmico de Luz (DLS - *Dinamic Light Scattering*), análise de nanopartículas por rastreamento (NTA- *Nanoparticle Tracking Analysis*) e análise por difração a laser (Cornillault, 1972; Goldberg, 1999; Filipe et al. 2010). Dentre elas, a técnica mais utilizada é a DLS, na qual as partículas são suspensas em um solvente líquido submetido a um movimento browniano aleatório. Esse movimento faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partículas é obtido. A característica importante do movimento browniano para o DLS é que partículas pequenas movem-se mais rapidamente do que as partículas maiores. Ou seja, partículas maiores se movem mais lentamente e espalham mais o laser. Partículas menores se movem mais rapidamente e espalham menos o laser (Malvern, 2007).

O PDI fornece informações acerca da homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas de um determinado sistema. Quanto menor o seu valor, mais monodispersa é a população de partículas (Nemen & Lemos-Senna, 2010). É calculado

pela análise da função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico de luz (Malvern, 2007).

1.4.2 Potencial zeta

O potencial zeta consiste no potencial de superfície das partículas. É medido por meio da aplicação de um campo elétrico através da dispersão. As partículas migram para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional a magnitude do potencial zeta. As técnicas mais utilizadas são microeletroforese e espalhamento de luz eletroforético (Honary & Zahir, 2013). Este parâmetro representa a medida das cargas e da repulsão/ atração, sendo capaz de indicar a estabilidade da suspensão, afetar as propriedades farmacocinéticas das nanopartículas no corpo, a fagocitose e a sua agregação na corrente sanguínea (Liao et al. 2009).

O valor em módulo de potencial zeta relativamente alto (em torno de 30mV) é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois fortes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Schaffazick et al. 2003; Ing et al. 2012).

A manipulação de características físico-químicas das nanopartículas pode influenciar a sua interação com células do sistema imune (Zolnik et al. 2010). As nanopartículas podem entrar em contato com a pele, trato gastrointestinal, corrente sanguínea ou outros tecidos do corpo, interagindo assim, com o sistema imunitário. A interação entre nanopartículas e os componentes do sistema imune é uma área de interesse (Pondman et al. 2015) e o seu entendimento pode ser usado para preparar nanopartículas capazes de evadir ou facilitar o reconhecimento pelo sistema (Zolnik et al. 2010).

1.5 Reconhecimento das nanopartículas pelo sistema imune

O sistema imune é uma organização de células e moléculas que podem desencadear dois tipos fundamentais de respostas imunes. A resposta imune adaptativa, que é caracterizada pela ação antígeno-específica de células T (envolvidas na imunidade mediada por células) e B que são responsáveis pela imunidade humoral (mediada por anticorpos). Uma vez ativadas contra um determinado antígeno, essas células são capazes

de reconhecê-lo em infecções subsequentes (Delves & Roit, 2000). A resposta imune inata, por sua vez, representa a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos. Nessa resposta estão envolvidos fagócitos profissionais, tais como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (Canton & Battaglia 2012), células responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios (mastócitos, eosinófilos e basófilos) e células NK (*Natural Killer*). Além de componentes moleculares que incluem complemento, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (Delves & Roit, 2000).

As células fagocíticas são células especializadas na fagocitose de resíduos celulares, de células apoptóticas, de bactérias e vírus, de partículas inertes ou opsonizadas, incluindo nanopartículas para entrega de fármacos (Hillaireau & Couvreur, 2009). A internalização por fagocitose seguida por digestão intracelular e a apresentação dos fragmentos na superfície da célula (apresentação de antígenos), processo combinado com a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e com a produção de citocinas ativam tipos celulares adicionais do sistema imune como linfócitos B e T (Bilitewski, 2008).

As células dendríticas, os macrófagos e as células B são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs) para células T, enquanto que as células foliculares dendríticas são as principais APC para células B. O processamento e apresentação de antígenos sinalizam estas células a proliferar e secretar anticorpos (células B); citocinas ($CD4^+$) ou tornar-se ativado para matar as células que expressam o antígeno apresentado pelas APCs ($CD8^+$) (Elsabahy & Wooley, 2013).

Assim como os microrganismos, a maior parte dos sistemas nanoestruturados que entram no corpo são reconhecidos como estranhos pelo sistema imune, que os detecta e tenta eliminá-los (Gammuci et al. 2014). O reconhecimento inadvertido de nanopartículas pelas células imunes pode conduzir a uma resposta imunitária contra as nanopartículas em vários níveis e, eventualmente, conduzir a toxicidade no hospedeiro e/ou a falta de eficácia terapêutica (Roy et al. 2014). A modulação das características das nanopartículas pode prolongar sua persistência *in vivo* e sua eficácia (Boraschi et al. 2012).

Um dos principais desafios na entrega de fármacos, quando se deseja a sua liberação sustentada, baseada em nanopartículas é a sua internalização pelas células fagocíticas do sistema reticuloendotelial (SRE), também conhecido como sistema fagocitário mononuclear (SFM) (Moghimi & Szebeni, 2003; Baiu et al. 2013). Esse sistema age como um mecanismo primário de defesa do hospedeiro e está distribuído por

todo o corpo e são principalmente responsáveis pela fagocitose, eliminação e iniciação da resposta imune devido à introdução dos nanomateriais, partículas exógenas ou antígenos no corpo (Elsabahy & Wooley, 2013). Os sistemas nanoestruturados para a entrega de fármacos não funcionalizados na sua superfície podem ser rapidamente reconhecidos e removidos da circulação sistêmica (Thasneem et al. 2011).

Os macrófagos, células que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, foram originalmente identificados por Metchnikoff, pela sua natureza fagocitária, são células antigas na filogenia de metazoários (Wynn et al. 2013). Os macrófagos desempenham muitos papéis-chave na defesa do hospedeiro, como remover as células mortas, detritos e patógenos por fagocitose, moldar a resposta inflamatória pela secreção de citocinas, enzimas e outros fatores e modular a imunidade adaptativa, apresentando antígenos aos linfócitos (Weissleder et al. 2014). Os macrófagos através da fagocitose e secreção de citocinas são importantes na mediação da resposta inflamatória, podendo ter impactos negativos na biocompatibilidade das nanopartículas (Liu et al. 2010).

A captação de nanopartículas é um processo de múltiplos passos, e geralmente começa na circulação sanguínea, com a opsonização. A opsonização pode promover o reconhecimento das nanopartículas pelos macrófagos e essas eventualmente podem se acumular nos órgãos do SFM, como o fígado e baço (Oh & Park, 2014). O processo de opsonização de nanopartículas ocorre pela adsorção de proteínas, tais como imunoglobulinas (Ig) G e M, componentes do complemento (C3, C4, C5), proteínas do soro do sangue, incluindo laminina e fibronectina. A nanopartícula opsonizada então se liga à superfície de macrófagos através de receptores específicos, como por exemplo, receptor Fc ou receptores de complemento (Sahay et al. 2010). Isto pode provocar um efeito negativo se a finalidade for aumentar o tempo de circulação e retenção das nanopartículas no organismo (Aggarwal et al. 2009).

As propriedades das nanopartículas (Figura 7), tais como o tamanho, a carga superficial, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e os efeitos estéricos de revestimento das partículas podem ditar a compatibilidade de nanopartículas com o sistema imunitário, ou seja, podem afetar o seu reconhecimento pelos macrófagos (Dobrovolskaia et al. 2008; Aggarwal et al. 2009).

A influência da carga de superfície e o tamanho de nanopartículas na fagocitose ainda não é claramente entendida. Acredita-se que nanopartículas carregadas são melhor fagocitadas por macrófagos por causa das interações eletrostáticas não específicas entre as células e as nanopartículas (Ahsan et al. 2002).

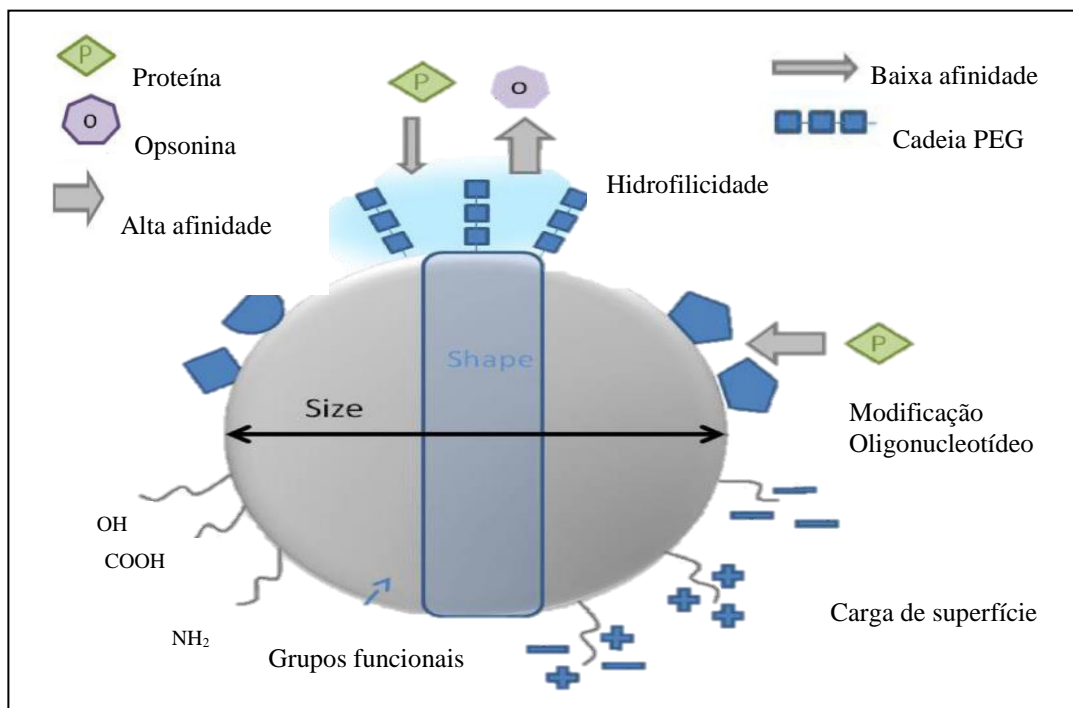


Figura 7 - Determinantes de interação de nanopartículas com as células. Fonte: Adaptado de Kettler et al. 2014. *Size*: tamanho; *Shape*: forma

Pesquisas indicam que as nanopartículas maiores são internalizadas por macrófagos de modo mais eficaz do que as menores (Brayner et al. 2013). Presume-se que partículas maiores que 200nm podem ser capturadas por fagocitose, enquanto partículas menores envolvem outras rotas de captura tais como endocitose mediada por clatrina e caveolina (Li et al. 2013). As partículas maiores podem coalescer na membrana celular em estrutura esférica podendo ser fagocitadas em um curto espaço de tempo (Fengjuan et al. 2013).

As partículas hidrofóbicas são opsonizadas de forma mais eficiente e rapidamente internalizadas e removidas da circulação em comparação com as hidrofílicas, que resistem a esse processo e são removidas mais lentamente (Figura 8) (Berry et al. 2003; Aggarwal et al. 2009; Sarmiento et al. 2011). Como exemplo, o PLA por possuir característica hidrofóbica torna a superfície da nanopartícula acessível à opsonização e posterior fagocitose (Mainardes, 2007).

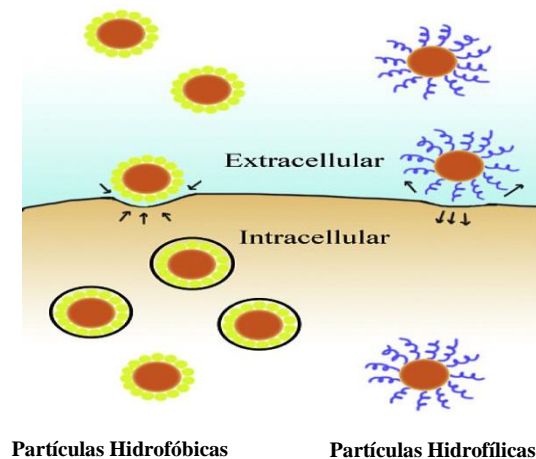


Figura 8 – Diferentes perfis de fagocitose de nanopartículas com diferenças de cargas.
 Fonte: Kou et al. 2013

A rápida eliminação do organismo dos sistemas nanoestruturados representa uma barreira para o direcionamento desses sistemas, limitando assim sua aplicação (Nahar et al. 2006). A capacidade das partículas circularem na corrente sanguínea durante um período de tempo prolongado é frequentemente um pré-requisito para a entrega direcionada (Balasubramanian et al. 2015).

A modificação da superfície das nanopartículas pode aumentar o seu tempo de permanência na circulação sanguínea e reduzir a distribuição não-específica, ou seja, promover o direcionamento daquilo que se deseja carrear (Alexis et. al 2008). Modificações de superfície das nanoestruturas com os polímeros de polietilenoglicol (PEG), poloxâmeros e poloxamina têm sido utilizados para evitar ou retardar a fagocitose (Dobrovolskaia & McNeil, 2007). Além disso, é possível adicionar polímeros como polietilenimina e polímeros contendo imidazol que proporcionam o escape endolisossomal, quando os princípios ativos são destinados a ter uma ação farmacológica no interior da célula (Chellat et al. 2005; Canton & Battaglia, 2012).

A maioria dos microrganismos são destruídos pelos macrófagos; porém, muitos microrganismos patogênicos desenvolveram meios para resistir à destruição por macrófagos após a fagocitose (Moghimi et al. 2005). Assim, em infecções como a leishmaniose, a malária e a tuberculose, por exemplo, os patógenos escapam da defesa e residem em macrófagos ficando, então, protegidos contra os fármacos presentes na circulação sistêmica, resultando na necessidade de terapia prolongada, a qual acaba por conduzir ao risco de desenvolvimento de resistência aos fármacos (Singh et al. 2008). A

propensão dos macrófagos para fagocitar as nanopartículas o torna um alvo farmacêutico, proporcionando uma abordagem para o direcionamento específico de carreadores nanoparticulados com agentes terapêuticos a essas células (Mohanraj & Chen, 2006).

O direcionamento de fármacos à macrófagos pode ser útil no tratamento de doenças como câncer, HIV, influenza e herpes. Dentre os fármacos candidatos que podem ser direcionados a macrófagos por meio de nanopartículas incluem penicilina, cefaloporinas, aminoglicósidos e fármacos usados em tratamento de câncer e AIDS (Ahsam et al. 2012).

Muitas reações imunoestimulantes iniciadas por nanopartículas são mediadas pela produção de citocinas inflamatórias. Estudos relataram a indução de citocinas por diferentes tipos de sistemas nanoestruturados, tais como dendrímeros e nanopartículas poliméricas (Zolnik et al. 2010).

Os macrófagos podem produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α , e citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- β em resposta a um estímulo. O balanço desses dois tipos de citocinas define a resposta imune que será gerada pelas nanoestruturas (Chung et al. 2006). Citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a produção de neutrófilos, estimular a proliferação e maturação de linfócitos. Citocinas anti-inflamatórias são capazes de modular os efeitos de citocinas pró-inflamatórias por inibição da produção de citocinas e/ ou bloqueio da ligação com receptores na superfície celular (Jones et al. 2006).

Dentre as citocinas produzidas por macrófagos, a IL-12 apresenta função importante por integrar imunidade inata e adaptativa, ela induz a produção de IFN- γ que é a principal citocina envolvida na ativação dos macrófagos, por células *natural killer* (NK) e linfócitos T, e favorece a diferenciação de células T para Th1, subconjunto da diferenciação dos linfócitos T CD4+ com base no padrão de citocinas (Xing et al. 2000). O IFN- γ age como um mediador da imunidade inata quando secretados por células NK ou em resposta a IL-12. Na imunidade adquirida, as células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento antigênico e a produção é acentuada por IL-12 (Abbas et al. 2008). A IL-12 é um heterodímero composto de duas subunidades, uma de 35 kDa (p35) e uma de 40 kDa (p40) ligadas por pontes dissulfeto, para produzir a citocina IL-12p70 (Anderson et al. 2006). Muitas células parecem sintetizar a subunidade p35, mas apenas fagócitos e células dendríticas produzem o componente p40 (Abbas et al. 2008).

A IL-10, dentre as citocinas anti-inflamatórias, é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias potentes, reprimindo a expressão de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 por macrófagos ativados (Zhang & Jianxiong, 2007). A IL 10 é produzida por macrófagos, células dendríticas, células B e T. Essa citocina pode atuar diretamente em células T CD4 inibindo a produção de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5. A IL-10 pode então regular respostas inatas e adaptativas Th1 e Th2 (Couper et al. 2008). As células Th1 promovem a imunidade mediada por células capazes de eliminar patógenos intracelulares e caracteristicamente produzem IL-2 e IFN- γ , enquanto as células Th2 requerem IL-4 para a sua diferenciação e produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Skinnider & Mak 2002). As células Th2 favorecem o desenvolvimento da resposta imune humoral e ativam a defesa contra patógenos extracelulares (Pelizon et al. 2007).

Borges (2012) visando investigar o efeito de nanopartículas sobre a resposta de macrófagos avaliou a produção das citocinas IL-10 e TNF- α e observou que as nanocápsulas de PLA e PLA-PEG induziram aumento significativo da produção de IL-10 com conseqüente diminuição na produção de TNF- α atuando então sobre os macrófagos de forma a promover a ativação de uma resposta anti-inflamatória. Gonçalves et al. (2015), por sua vez, ao investigar o perfil de citocinas (IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-12/23) secretadas por macrófagos observou que nanopartículas Ch/ γ -PGA (quitosana/ γ -ácido glutâmico) estimularam a produção de IL-6 e TNF- α .

Diante disto, torna-se relevante o entendimento do perfil de fagocitose e produção de citocinas desencadeadas por diferentes tipos de nanopartículas poliméricas. A compreensão deste mecanismo desencadeado por estas estruturas poderá ser usada para o desenho racional de sistemas nanoestruturados para a entrega de fármacos.

2 JUSTIFICATIVA

Uma das principais aplicações da nanobiotecnologia é o desenvolvimento de sistemas para entrega de princípios ativos, sejam fármacos ou outras biomoléculas. Atualmente algumas dessas preparações nanoestruturadas já estão disponíveis para o uso clínico, podendo-se citar antifúngicos, anticancerígenos e imunossuppressores (Felipe & Amaral, 2008; Amaral et al. 2010). O sucesso da utilização de nanopartículas depende de fatores como o tamanho e o tipo de material usado na sua preparação. Além do tamanho, o material utilizado na preparação de um nanossistema permitirá definir o seu comportamento em uma aplicação biológica (Jain, 2000; Reis et al. 2006).

As nanopartículas são promissoras no tratamento dos mais diversos tipos de doenças, pois fármacos transportados por estes sistemas podem ser direcionados para o local onde se deseja que ele atue. Podem em alguns casos, serem interessantes para atingir alvos intracelulares. Assim, medicamentos capazes de serem direcionados para o interior de macrófagos é uma excelente possibilidade para tratar as doenças infecciosas que atingem essas células. Além disto, essas células são capazes de desencadear a produção de citocinas, ajudando o organismo a combater o patógeno, aumento a eficácia terapêutica do tratamento. Dentre as nanopartículas utilizadas na área da saúde, merecem destaque as poliméricas, por sua versatilidade de preparação usando polímeros biodegradáveis, dentre os quais o PLGA e a quitosana.

Desse modo torna-se relevante o entendimento do processo de fagocitose dessas nanopartículas por macrófagos, além da toxicidade e produção de citocinas desencadeadas por elas, pois assim será possível preparar sistemas carreadores de fármacos mais eficientes, que apresentem as propriedades mais próximas das ideais para o carreamento de um princípio ativo e que tragam maiores benefícios para a população. Espera-se contribuir para o conhecimento científico pelo entendimento da influência dessas nanopartículas no sistema imunológico.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de citocinas desencadeadas por nanopartículas poliméricas de quitosana, de poli (lático-*co*-glicólico) e de quitosana contendo nanopartículas magnética e a sua fagocitose por macrófagos RAW 264.7.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar nanopartículas poliméricas de quitosana e de poli (lático-*co*-glicólico - PLGA) vazias;
- Preparar e caracterizar nanopartículas poliméricas de quitosana contendo nanopartículas magnéticas;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de quitosana e de PLGA sobre macrófagos murinos, linhagem RAW 264.7;
- Quantificar a produção das citocinas (IL12p40, IL10 e TNF- α) desencadeadas pelas nanopartículas de quitosana, de quitosana contendo nanopartículas magnéticas e de PLGA em cultura de macrófagos murinos, linhagem RAW 264.7;
- Investigar por microscopia eletrônica de transmissão, a internalização de nanopartículas de quitosana contendo nanopartículas magnéticas por macrófagos murinos, linhagem RAW 264.7;
- Quantificar a produção das citocinas IFN- γ e IL-4 no soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos Balb/C após administração de nanopartículas de quitosana.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação e caracterização das nanopartículas

4.1.1 Preparação de nanopartículas de quitosana

As nanopartículas de quitosana foram produzidas pela técnica de gelificação iônica de acordo com a metodologia descrita por Calvo et al. (1997). Para isto, uma solução de quitosana (2 mg/mL) foi preparada por meio da dissolução do polímero por sonicação em 0,1 M de ácido acético durante 10 minutos ou até que a solução estivesse transparente. O pH da solução foi ajustado com NaOH 0,1M para 4.4. Em 15 mL de solução de quitosana, foram adicionados lentamente 8 mL (200ul por vez) de solução de Tripolifosfato de sódio (TPP) 1mg/mL, na proporção de 3:0,8 (Quitosana:TPP). A suspensão de nanopartículas foi mantida sob agitação magnética por 1 hora, em seguida foi centrifugada por três vezes (10 min a 20000g) para lavagem com água ultrapura. As nanopartículas ficaram dispersas em água ultrapura e apresentaram o pH de $5,42 \pm 0,42$.

4.1.2 Preparação de nanopartículas de poli (lático-*co*-glicólico) – PLGA

As nanopartículas de PLGA foram preparadas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente de acordo com o protocolo adaptado de Julienne et al. (1992). O polímero PLGA (120 mg) foi solubilizado em 10 ml de diclorometano. Esta solução foi emulsionada em 25 mL de uma solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) (3%), sendo a solução de PLGA adicionada gota a gota à solução de PVA. O sistema foi mantido em agitação leve por 18 horas para a evaporação do solvente. As nanopartículas foram então centrifugadas a 2800g por 5 minutos pra separar partículas grandes e então o sobrenadante foi coletado e as nanopartículas ressuspensas em água ultrapura e após

foram centrifugadas mais três vezes por 30 min a 2800g. As nanopartículas ficaram dispersas em água e apresentaram um pH de $6,4 \pm 0,16$.

4.1.3 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas de maguemita funcionalizadas com TPP foram doadas pela Profa. Dra. Emília Lima, do Laboratório de Química da Universidade Federal de Goiás.

As nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , em proporções estequiométricas e em meio alcalino. O precipitado de cor preta obtido, característico da magnetita, foi isolado por separação magnética e lavado para remoção dos contra-íons. Em seguida as nanopartículas de magnetita foram oxidadas a maguemita e posteriormente foi realizada a funcionalização com TPP. As nanopartículas apresentaram uma concentração de ferro total de 9,4mg/mL.

4.1.4 Preparação de nanopartículas de quitosana contendo nanopartículas magnéticas

As nanopartículas de quitosana com magnéticas de maguemita funcionalizadas com TPP foram produzidas pela técnica de gelificação iônica. Para isto, foi preparada uma solução de quitosana (2 mg/mL) por meio da dissolução do polímero por sonicação em 0,1 M de ácido acético até que a solução estivesse transparente. O pH da solução foi ajustado com NaOH 0,1M para 4,4. As nanopartículas magnéticas foram então dissolvidas em água ultrapura (1 mg/mL). O volume de 8 mL de solução de nanopartículas magnéticas foi adicionado lentamente (200 μ l por vez) em 15 mL de solução de quitosana, chegando à proporção de 3:0,8 (Quitosana:Magnética). A suspensão de nanopartículas foi mantida sob agitação magnética por 1 hora, em seguida foi centrifugada uma vez (30 min a 20000g). As nanopartículas ficaram dispersas em água ultrapura e apresentaram um pH de $4,6 \pm 0,09$.

4.1.5 Caracterização das nanopartículas

4.1.5.1 Diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta

As nanopartículas dispersas em água foram caracterizadas quanto ao diâmetro e índice de polidispersão pela técnica de espalhamento dinâmico de luz. Os valores de potencial zeta foram obtidos através da técnica de espalhamento de luz eletroforético. O volume de 1 mL e 2 mL das suspensões de nanopartículas foram utilizados para as análises do diâmetro e índice de polidispersão e potencial zeta, respectivamente.

4.1.5.2 Análise da morfologia das nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão

Alíquotas das amostras de nanopartículas foram dispersas em etanol usando um limpador ultrassônico. Em seguida, as dispersões foram gotejadas sobre as telas de cobre recobertas com carbono. Após a secagem foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), Jeol, JEM-2100, equipado com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Thermo Scientific. Nanopartículas de quitosana também foram contrastadas com ácido fosfotúngstico e tetróxido de ósmio e então examinadas por MET.

4.1.6.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) foi utilizada para constatar a presença de ferro nas amostras de nanopartículas de quitosana contendo nanopartículas magnéticas. As informações sobre os elementos presentes são obtidas pela captação dos raios-X característicos resultantes da interação do feixe primário com a amostra.

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Macrófagos RAW 264.7

A linhagem RAW 264.7 foi utilizada para avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana e de PLGA, a fagocitose das nanopartículas poliméricas de quitosana contendo nanopartículas magnéticas e a produção de citocinas desencadeadas por nanopartículas poliméricas de quitosana, PLGA e quitosana contendo magnética.

Esta é uma linhagem celular aderente e imortalizada por vírus (Raschke et al. 1978) que preserva as características de uma célula fagocítica do sistema mononuclear. As células foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Patrícia Resende Alo Nagib Loyola e foram cultivadas em garrafas para cultura celular com meio RPMI completo (10% de soro fetal bovino (SFB), Glutamina 2mM/mL, solução bicarbonato 7,5% a 12mM) em estufa com 5,0% de CO₂ e a 37 °C. O meio de cultura foi trocado e repiques foram feitos dependendo da necessidade do cultivo.

Para a descolagem das células, todo o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS, seguido pela adição de tripsina a cada garrafa e mantido em estufa (37 °C), durante 5 a 8 minutos. Após esse tempo, as células foram descoladas e foi adicionado o meio RPMI contendo SFB, agente inativante da tripsina. O meio contendo as células foi transferido para tubos Falcon sendo centrifugados (10 minutos a 112g a 4 °C) para formação de *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de meio de cultura RPMI completo. A concentração de células foi determinada utilizando-se um hemocítmetro e a viabilidade com o corante Azul de Tripán.

4.2.2 Avaliação de citotoxicidade em macrófagos

A avaliação da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 foi realizada pelo ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan, o qual é um produto de coloração azulada (Mosmann, 1983). A vantagem desse ensaio é a não utilização de radioisótopos e a ampla aplicação em todos os tipos celulares (Roehm et al. 1991).

Preparou-se uma suspensão contendo 5×10^5 células/mL e 100µl da mesma foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo chato. Após 24 horas de cultivo, descartou-se o sobrenadante de cada poço e foi acrescentado 200µl de RPMI suplementado contendo as soluções de nanopartículas de quitosana e de PLGA. Foram realizadas diluições seriadas 1:2 sendo a maior concentração testada de 4mg/mL e a menor de 0,25mg/mL.

Após 24h de incubação com as nanopartículas, acrescentou-se 22µl de reagente de MTT a 5mg/mL e incubou-se a 37 °C com 5% de CO₂ por 4 horas no escuro. Em seguida

os sobrenadantes foram descartados e em cada poço acrescentou-se 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Para homogeneização, a placa foi colocada no *shaker*, durante 15 minutos à 150g. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro de microplacas a 542nm. Macrófagos cultivados nas mesmas condições sem a presença de nanopartículas foram utilizados como controle e considerados no cálculo da porcentagem de viabilidade. O LPS (LPS de *E.coli* - Sigma) foi utilizado como controle positivo. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a equação abaixo.

$$\% \text{ células vivas} = (100 \times A_v) / A_{\text{RPMI}}$$

A_v : Absorbância da amostra

A_{RPMI} : Média das absorbâncias das amostras tratadas com RPMI

A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) para comparação entre os estímulos ($p < 0,05$).

4.2.3 Análise da fagocitose de nanopartículas de quitosana contendo magnética por microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar a internalização das nanopartículas de quitosana contendo magnéticas, os macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na densidade de 5×10^5 células/ poço, num volume final de 1000µL, em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas, para a adesão das células, o sobrenadante foi descartado e foram então adicionadas as nanopartículas de quitosana contendo as magnéticas (1000µL), que foram previamente incubadas com soro de camundongo por 1 hora.

A incubação prévia das nanopartículas com soro de camundongo foi necessária para garantir a opsonização das nanopartículas de quitosana contendo magnéticas. O soro de camundongos Balb/C foram coletados para posterior incubação com as nanopartículas. Os camundongos foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma solução de cetamina (100mg/mL) e xilazina (20mg/mL). Após a anestesia, o sangue foi coletado do plexo retro-orbital. As amostras de sangue foram mantidas em tubos do tipo eppendorfs em estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse período os tubos foram centrifugados (10 minutos, 112g) e o soro presente no sobrenadante, foi recolhido e mantido a -20 °C até o momento da incubação com as nanopartículas.

As células com as nanopartículas foram incubadas por (2h, 4h e 24h) em estufa com 5,0% de CO₂ e a 37 °C. Após cada um desses tempos o sobrenadante foi descartado

e a monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes com PBS. Para obtenção das células foi utilizada solução de tripsina e a placa foi incubada por 5 a 8 minutos para descolar os macrófagos. Após esse período, foi adicionado o meio de cultura suplementado aos poços. A solução foi homogeneizada e transferida para falcons.

Os falcons foram centrifugados por 10 minutos a 700g, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% e ácido pícrico 0,2% em tampão cacodilato e mantidas a 4 °C por 24 horas. Após esse período foi realizada a lavagem no mesmo tampão, seguindo-se pela fixação em tetróxido de ósmio a 1% e desidratação em banhos de acetona com concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%) e então infiltradas em resina. Após a polimerização em estufa a 60 °C por 48h, os blocos foram trimados. Em seguida, cortes ultrafinos obtidos foram colocados em telas de cobre e contrastados com uranila e chumbo para observação no microscópio.

4.2.3 Cultura de macrófagos com nanopartículas para dosagem de citocinas

A indução da produção de citocinas *in vitro* pelas nanopartículas foi analisada usando-se macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços, a uma densidade de 5×10^5 células/mL. Em seguida, as células foram incubadas em estufa com 5,0% de CO₂ e a 37 °C por 24 horas.

Após 24 horas de cultivo, descartou-se o sobrenadante de cada poço e foram então adicionados os seguintes estímulos: nanopartículas de quitosana, nanopartículas de quitosana contendo magnética e nanopartículas de PLGA a uma concentração de 1mg/mL. O LPS (LPS de *E.coli* - Sigma) a uma concentração de 1 µg/mL foi utilizado como controle positivo, enquanto o meio de cultura RPMI foi utilizado como controle negativo. Após 4h e 24h de incubação em estufa com 5,0% de CO₂ e a 37 °C, alíquotas do sobrenadante foram coletados e estocados a -20 °C até o momento da dosagem das citocinas, usando kits comerciais para IL12p40, IL10 e TNF- α .

4.3 Ensaios *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados para avaliar a resposta imune de camundongos às nanopartículas de quitosana.

Foram utilizados 14 camundongos Balb/C, entre 6 e 8 semanas de idade, pesando entre 20 e 25 gramas os quais foram fornecidos pelo biotério do Instituto de Patologia

Tropical e Saúde Pública - IPTSP da Universidade Federal de Goiás. Os camundongos foram mantidos no biotério em estantes ventiladas com água *ad libitum* e dieta padrão para a espécie. Os ensaios *in vivo* foram aprovados conforme parecer CEUA N. 083/15.

4.3.1 Grupos experimentais

Os camundongos foram agrupados em três grupos: grupo controle (quatro animais) foram injetados 50µl de NaCl 0,85% por via intramuscular e nos outros dois grupos (5 animais cada) foram injetados por via intramuscular 50µl de nanopartículas de quitosana. Após 24 horas da injeção, um grupo que recebeu nanopartículas de quitosana e dois camundongos do grupo controle foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma solução de cetamina (100mg/mL) e xilazina (20mg/mL) para a coleta do sangue para posterior avaliação da resposta imune. O outro grupo que recebeu quitosana e os dois camundongos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento para coleta de sangue e baço para avaliar a resposta imune após sete dias da injeção, como esquematizado na Figura 9.

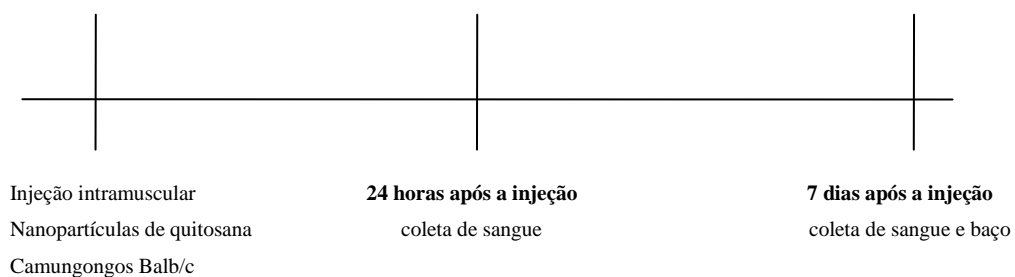


Figura 9 - Esquematização dos ensaios *in vivo* para avaliar a resposta imune.

4.3.2 Dosagem das citocinas IFN- γ e IL4

As citocinas foram dosadas no soro dos animais após 24 horas e sete dias da injeção intramuscular. O sangue coletado, nos animais previamente anestesiados conforme descrito acima, foi mantido em tubos do tipo eppendorfs em estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse período os tubos foram centrifugados por 10 min, 112g e o soro

presente no sobrenadante, foi recolhido e mantido a -20 °C até o momento da dosagem das citocinas.

4.3.3 Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos

Os baços dos animais de cada grupo, controle e quitosana, após 7 dias da injeção, foram coletados e dispostos em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 gelado e mantidos imersos em gelo. Em uma placa de Petri esses baços foram divulsionados em meio RPMI 1640. O meio foi coletado e centrifugado a 112g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 3mL de tampão de lise de hemácias (150mM de NH₄Cl, 10mM de NaHCO₃, 0,1mM de EDTA, pH 7,4) durante três minutos com leve agitação do tubo a cada um minuto. O volume foi completado para 45mL com PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e gentamicina 40mg/mL. A concentração de células totais viáveis foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se o azul de Trypan como corante para a seleção das células viáveis.

Para a cultura das células, foram plaqueadas 3×10^5 células/ 100µl em cada poço de uma placa de 96 poços.

Na avaliação da produção de citocinas desencadeadas por nanopartículas de quitosana a partir da cultura de esplenócitos foram utilizados os seguintes estímulos: quitosana para avaliar a memória imunológica; LPS, conhecido como ativador da resposta imune; fitohemaglutinina (PHA), mitógeno que estimula a proliferação de linfócitos. Foram adicionados às células no volume de 100µl e em duplicata os estímulos: quitosana; lipopolissacarídeo (LPS) e PHA e como controle negativo o meio de cultura RPMI 1640. A placa foi então mantida em estufa a 5% de CO₂ e a 37 °C. O sobrenadante da cultura foi coletado após 24h, 72h e 120h sendo mantido a -20 °C até o momento das dosagens das citocinas.

4.4 Dosagem de citocinas pela técnica de ELISA

No sobrenadante da cultura de macrófagos foram dosadas as citocinas IL-12p40, TNF- α e IL-10. No soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos foi avaliado o perfil da resposta imune mediada por células, especificamente IFN- γ (citocina de resposta imune de padrão Th1) e IL-4 (citocina da resposta imune de padrão Th2).

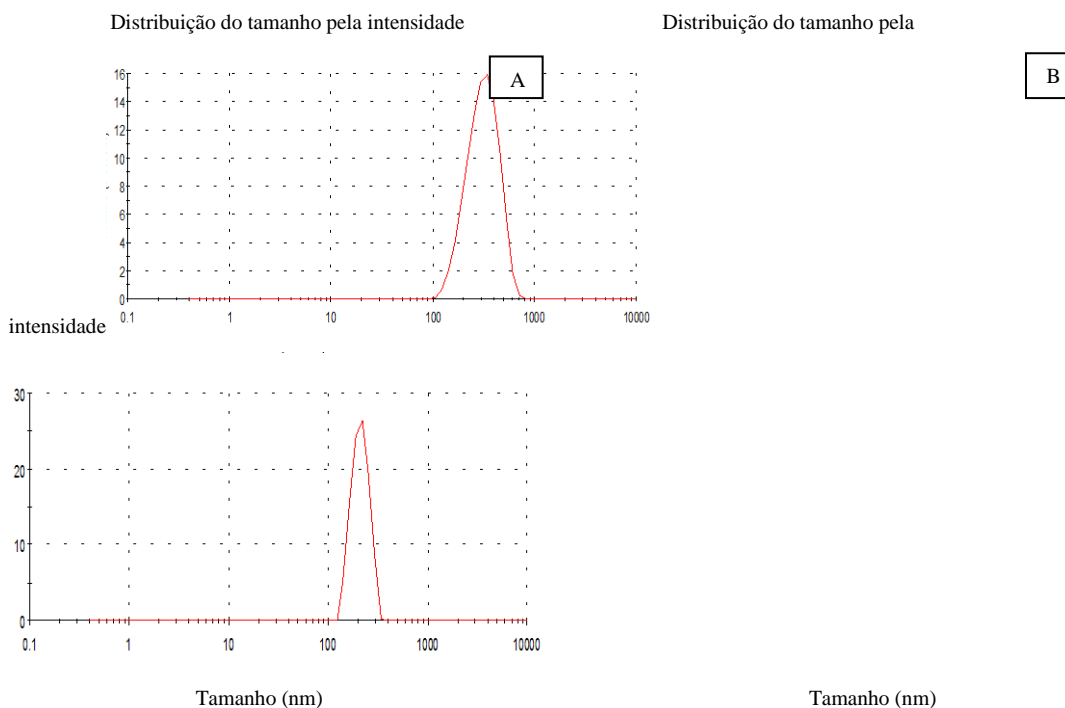
Para a realização da dosagem de citocinas por ELISA foram utilizados kits comerciais (Kit ELISA BD OptEIA), para cada citocina de interesse. O protocolo foi seguido conforme determinado pelo fabricante e brevemente descrita a seguir. As placas de ELISA de 96 poços foram seladas e incubadas a 4 °C por 18 horas com os anticorpos específicos para cada citocina de interesse, diluído em tampão de fosfato 0,2M ou carbonato, para um volume total de 100 μ L/ poço segundo determinações do fabricante. Após a sensibilização as placas foram lavadas de 3 a 5 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas em 200 μ L/ poço de solução de PBS com soro fetal bovino (SFB) por 1 hora à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem, foi feita a diluição das amostras e dos padrões em solução diluente (PBS com SFB) num volume total de 100 μ L/ poço, e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem o anticorpo de detecção e a enzima foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora num volume de 100 μ L/ poço. Após esse período de incubação e novo ciclo de lavagem, adicionou-se cromógeno (TMB Substrate Reagent Set, BD Biosciences) para a formação da cor. A reação foi interrompida após 30 minutos de incubação no escuro com 50 μ L /poço de 2NH₂SO₄.

A leitura das placas foi feita a 450 nm em leitora de ELISA. A concentração das citocinas, expressa em picogramas por mL (pg/mL), presente nas amostras foi calculada baseado nas curvas padrões dos respectivos recombinantes utilizados.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das nanopartículas de quitosana e de poli(láctico-co-glicólico, PLGA) vazias e nanopartículas de quitosana contendo magnéticas

As nanopartículas foram caracterizadas em função do tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Os gráficos da distribuição de tamanho das nanopartículas pela intensidade e representativos de cada análise, obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DSL), estão apresentados na Figura 10. Nos gráficos, observa-se que cada amostra apresentou um único pico com intensidade de 100%, mostrando homogeneidade das preparações de nanopartículas e são, portanto, consideradas de boa qualidade. O diâmetro médio para o tamanho (nm) das nanopartículas de quitosana, de PLGA e de quitosana contendo magnética foram de 239 ± 2 , $266,2 \pm 11,4$, $255,9 \pm 17,6$, respectivamente.



Distribuição do tamanho pela intensidade

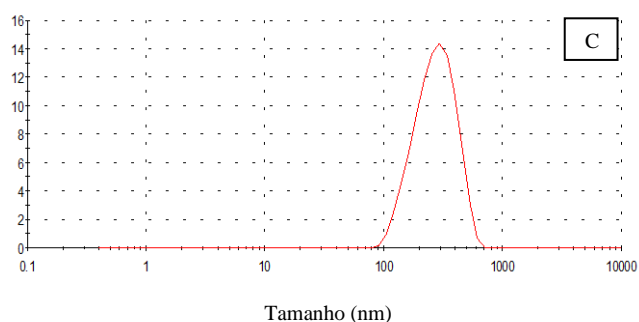


Figura 10 - (A) Distribuição de tamanho de nanopartículas de quitosana, (B) nanopartículas de PLGA, (C) nanopartículas de quitosana contendo magnética.

De um modo geral, as nanopartículas obtidas por diferentes métodos apresentam diâmetro médio menor que 300nm, um baixo índice de polidispersão ($<0,5$), que reflete a homogeneidade no tamanho das partículas, como pode ser observado na Tabela 1, na qual pode também ser verificado o potencial zeta das nanopartículas.

Tabela 1 – Tamanho, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta de nanopartículas de quitosana e de PLGA vazias e de quitosana contendo magnética.

	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
Nanopartículas de quitosana	239±2	0,24±0,05	40,2±0,3
Nanopartículas de PLGA	266,2±11,4	0,07±0,09	-18,1±0,9
Nanopartículas de quitosana contendo magnética	255,9±17,6	0,24±0,04	56,3±0,4

Resultados expressos como média ± desvio padrão. As amostras foram analisadas em triplicata.

5.1.2 Morfologia das nanopartículas

Com a finalidade de se investigar os aspectos morfológicos das nanopartículas as mesmas foram submetidas às análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A morfologia das nanopartículas de PLGA apresentaram formato esférico e superfície regular (Figura 11).

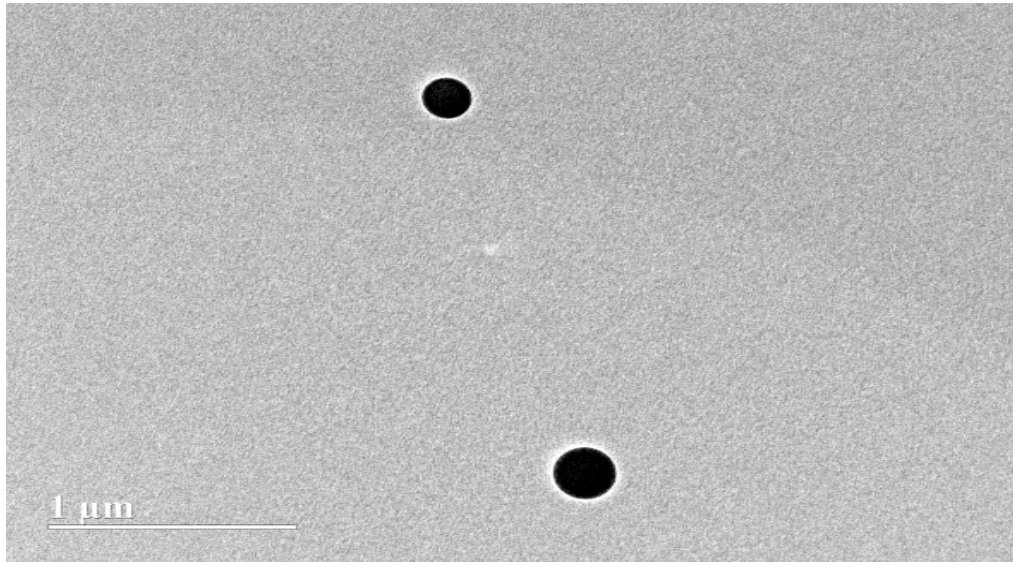


Figura 11 - Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de PLGA

Pelas imagens de MET obtidas de nanopartículas de quitosana (Figura 12A) observa-se a formação de redes reticuladas. Na tentativa de se visualizar melhor o contorno das nanopartículas de quitosana foram utilizados dois contrastes. Com o contraste ácido fosfotúngstico foi possível observar a formação de algumas estruturas semi esféricas e estruturas mais claras (Figura 12B). Já com o tetróxido de ósmio foram observadas estruturas escuras não definidas (Figura 12C). Os contrastes utilizados não foram conclusivos.

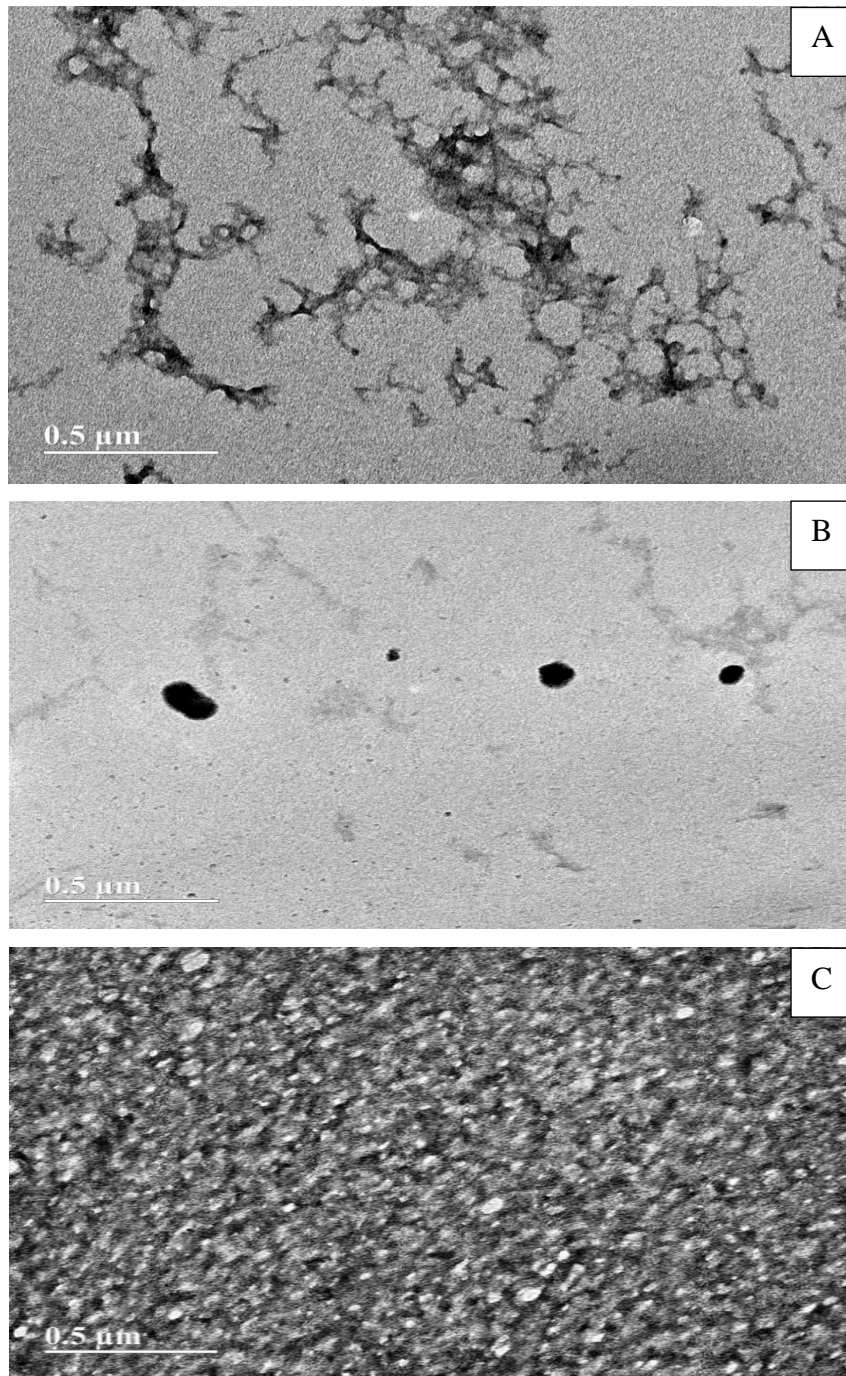


Figura 12 – (A) Nanopartículas de quitosana; (B) Amostra das nanopartículas de quitosana com o contraste Fosfotúngstico; (C) Amostra das nanopartículas de quitosana com o contraste Tetróxido de Ósmio.

A Figura 13 mostra micrografias MET de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com TPP e nanopartículas de quitosana contendo magnéticas funcionalizadas com TPP. As imagens mostram nanopartículas com morfologia “quase esférica” e distribuição de tamanho homogênea. Não foram detectadas visualmente diferenças entre as nanopartículas magnéticas e as que foram preparadas com nanopartículas de quitosana utilizando MET. No entanto, ao se utilizar Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (HRTEM), que é mais sensível que o MET, foi possível observar uma fina camada de quitosana envolvendo as nanopartículas magnéticas (Figura 14). Pode-se observar planos cristalinos e linhas paralelas, parecendo ranhuras típicas das nanopartículas magnéticas. Entretanto, essas linhas não se estendem para as bordas da nanopartículas, sendo possível observar uma delimitação das mesmas. A área próxima à borda da nanopartícula que não inclui os planos cristalinos corresponde a quitosana e que está indicada pela seta na imagem.

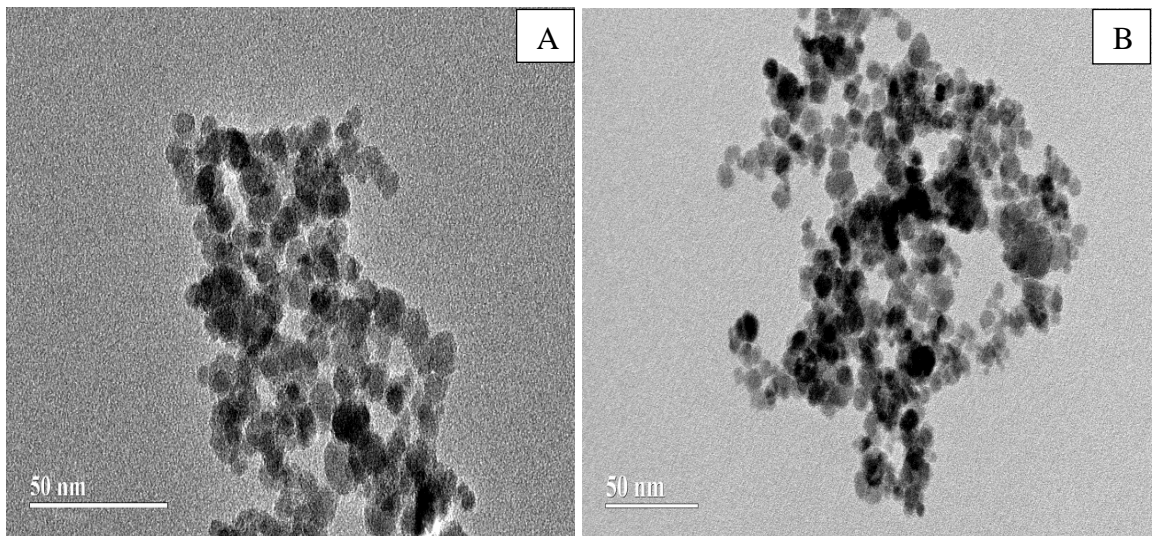


Figura 13 - Micrografias TEM de nanopartículas (A) magnéticas e (B) quitosana contendo magnética.

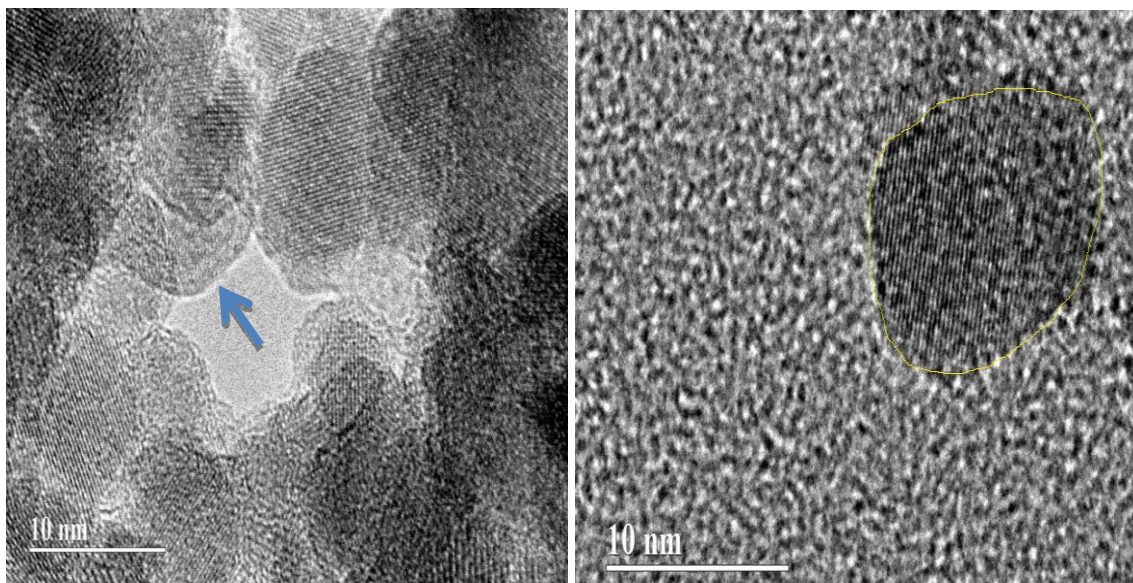


Figura 14 - Micrografia HRTEM de nanopartículas de quitosana contendo magnética preparadas pelo método de gelificação iônica. (A) A camada de quitosana envolvendo as magnéticas (seta); (B) A linha amarela delimita a região cristalina de uma única nanopartícula.

Para confirmar a presença de ferro nas nanopartículas de quitosana contendo magnética foi realizada a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), onde foi possível observar a presença de ferro na amostra analisada (Figura 15). Os picos indicando a presença de cobre são da tela (*grind*) utilizada na preparação das amostras para análise.

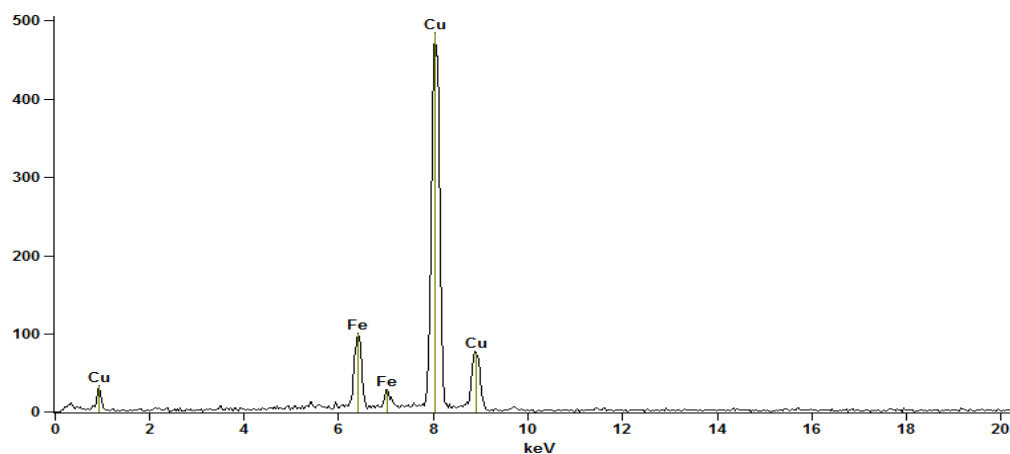


Figura 15 - Espectro de EDS de micrografia de nanopartículas de quitosana magnética.

5.2 Ensaios *in vitro*

5.2.1 Citotoxicidade das nanopartículas

A viabilidade celular dos macrófagos não foi afetada significativamente nas concentrações de nanopartículas testadas, com exceção da maior concentração (4mg/mL) que apresentou redução significativa da viabilidade no tempo analisado de 24h. O LPS, como esperado, usado como controle positivo do ensaio, apresentou citotoxicidade (Figura 16).

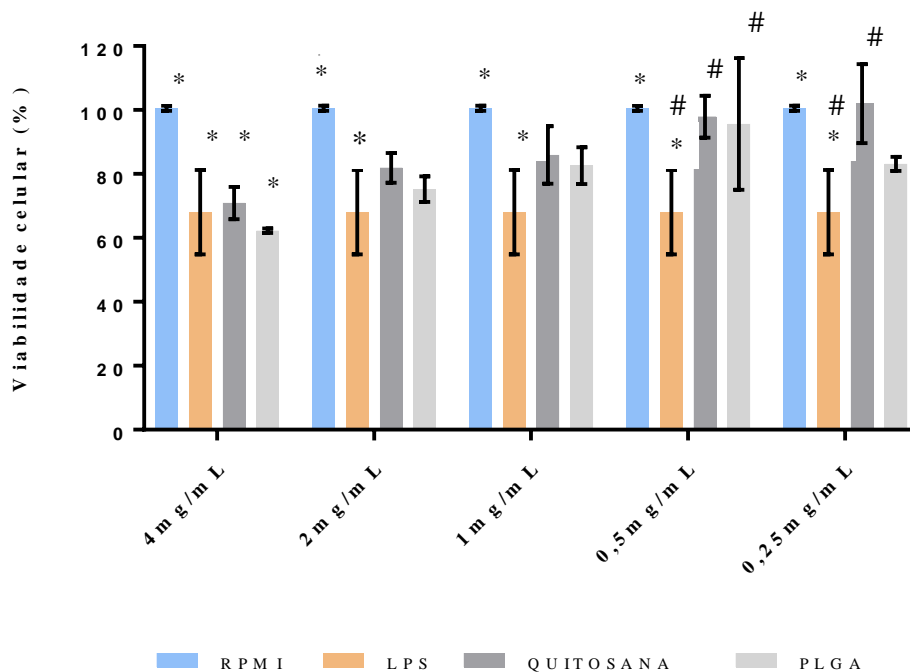


Figura 16 – Efeitos das nanopartículas de Quitosana e de PLGA na viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7. O meio de cultura RPMI foi utilizado como controle negativo. *Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o meio de cultura RPMI e os estímulos. # Diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o LPS e os outros estímulos. Amostras em duplicata provenientes de dois ensaios independentes. Resultados expressos como a média \pm desvio padrão.

5.2.2 Fagocitose de nanopartículas de quitosana por macrófagos

As análises por microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas para investigar a internalização de nanopartículas de quitosana. As nanopartículas magnéticas foram incorporadas para marcar as nanopartículas de quitosana para possibilitar a sua visualização na microscopia.

Na Figura 17A pode-se observar a estrutura do macrófago, apresentando núcleo com contorno irregular e presença característica de pseudópodes que variam em tamanho e em formato e o citoplasma apresentando vesículas.

Após 2 horas de co-cultivo com as nanopartículas de quitosana contendo magnéticas observa-se que estas encontram-se localizadas extracelularmente e próximas à membrana celular (Figura 17 B). Já no período de incubação de 4 horas, elas encontram-se no meio intracelular (Figura 17 C e D). Em 24 horas de incubação, foi possível também observar nanopartículas próximas aos pseudópodes sendo internalizadas pelos macrófagos e também no seu interior. Assim como podem ser observadas nanopartículas extracelularmente, mas próximas à membrana (Figura 17 E e F).

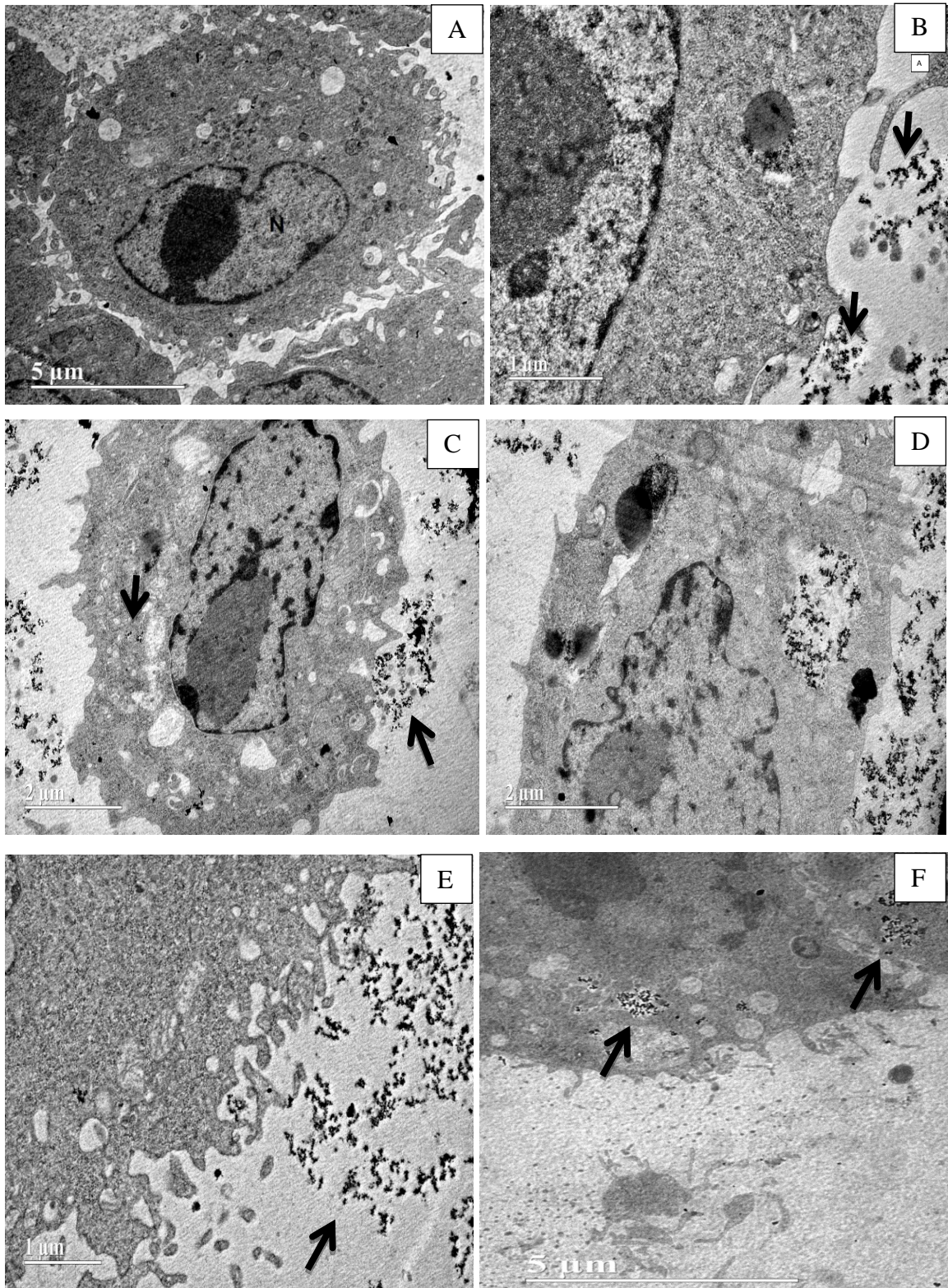


Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de quitosana magnética internalizadas por macrófagos. (A) Macrófagos controle; (B) 2 horas de incubação de nanopartículas de quitosana magnética; (C e D) 4 horas de incubação; (E e F) 24 horas de incubação. N: núcleo; setas: nanopartículas.

Em todos os tempos de incubação analisados foi realizado EDS para comprovar a existência das nanopartículas magnéticas. O espectro EDS representativo das análises realizadas é mostrado na Figura 18. Os picos indicando a presença de outros elementos químicos além do ferro são decorrentes da preparação das amostras para posterior visualização por microscopia de transmissão.

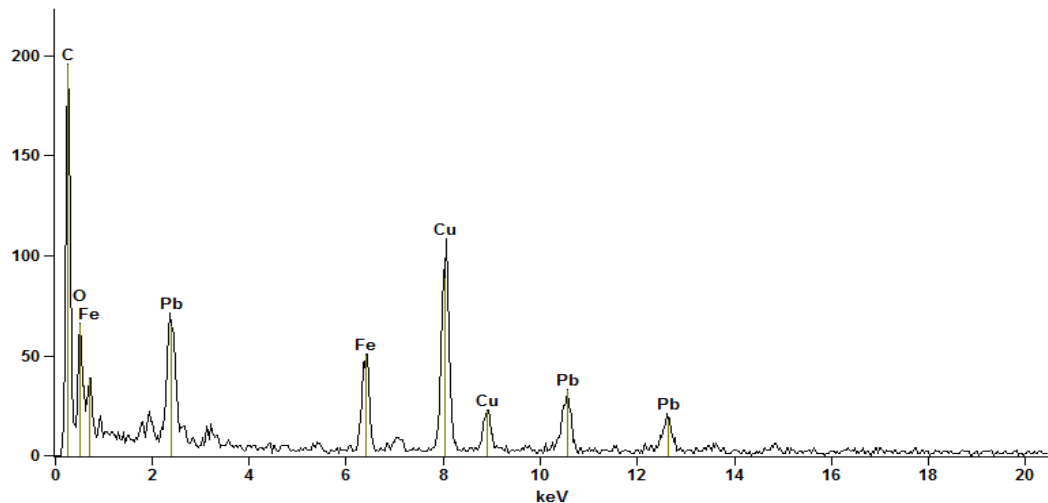


Figura 18 - Espectroscopia de Energia Dispersiva EDS das nanopartículas de quitosana magnéticas incubadas com os macrófagos.

5.2.3 Produção de citocinas em cultura de macrófagos

A modulação da produção das citocinas TNF- α , IL12p40 e IL10 pelos macrófagos RAW 264.7 cultivados com nanopartículas de quitosana, quitosana contendo magnética e PLGA foi investigada *in vitro* nos tempos de 4h e 24h.

Foi observado que as nanopartículas induziram uma alta produção de TNF- α (maior que 3000pg/mL) tanto em 4h quanto em 24h, apresentando valores similares entre os grupos analisados e semelhantes, inclusive ao controle positivo (LPS) (Tabela 2). Observa-se também, considerando-se, as médias e o desvio padrão, que não tem diferença entre os dois tempos investigados.

Tabela 2 - Concentrações de TNF- α (pg/mL) no sobrenadante da cultura de macrófagos

Grupos	TNF-α	
	4h	24h
RPMI	2374.3 \pm 90,2	1961.7 \pm 106
LPS	4366.8 \pm 143,7	4543.6 \pm 231,3
QUITOSANA	4529.8 \pm 53,1	4160.4 \pm 68,7
QM	4349.3 \pm 47,5	4297.8 \pm 89,7
PLGA	4175.8 \pm 35,9	4239.9 \pm 150,3

Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura RPMI e como controle positivo o LPS. QM – Quitosana Magnética. Amostras dosadas em duplicata provenientes de um ensaio. Resultados expressos como a média \pm desvio padrão.

Para a IL12p40 foi possível determinar os valores somente para 24h. O controle positivo (LPS) apresentou uma elevada produção, maior do que as desencadeadas pelas nanopartículas. Nanopartículas de PLGA apresentaram valores maiores que as de Quitosana, mas os valores foram baixos quando comparados ao LPS (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações de IL12p40 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de macrófagos

Grupos	IL12p40	
	4h	24h
RPMI	0	0
LPS	0	144.662 \pm 2,5
QUITOSANA	0	1.476 \pm 0,05
QM	0	4.302 \pm 0,15
PLGA	0	9.839 \pm 0,38

Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura RPMI e como controle positivo o LPS. QM – Quitosana Magnética. Amostras dosadas em duplicata provenientes de um ensaio. Resultados expressos como a média \pm desvio padrão.

A produção de IL10 em 24h para o controle positivo (LPS) foi alta, enquanto que as nanopartículas desencadearam uma baixa produção de IL10 tanto em 4h quanto em 24h (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentrações de IL-10 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de macrófagos

Grupos	IL-10	
	4h	24h
RPMI	0	10.825±2,9
LPS	21.442±1,5	351.865±28,6
QUITOSANA	2.501±5,7	0
QM	0	1.912±0,06
PLGA	1.912±0,03	0

Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura RPMI e como controle positivo o LPS. QM – Quitosana Magnética. Amostras dosadas em duplicata provenientes de um ensaio. Resultados expressos como a média ± desvio padrão.

4.2 Ensaio *in vivo*

5.3.1 Influência das nanopartículas de quitosana na modulação *in vivo* da produção de IFN- γ e IL-4

Para avaliar a influencia das nanopartículas de quitosana na modulação da produção das citocinas IFN- γ e IL-4, as mesmas foram injetadas em camundongos Balb/C. Após 24h e 7 dias os animais foram eutanasiados e as citocinas foram dosadas no soro e no sobrenadante de cultura de esplenócitos.

5.3.1.1 Dosagem de IFN- γ e IL-4 no soro

A produção de IFN- γ (Tabela 5) no grupo que recebeu nanopartículas de quitosana (Quitosana) foi semelhante ao grupo controle (salina) após 24h da administração de nanopartículas de quitosana. No entanto, após sete dias foi possível observar um aumento da produção dessa citocina no grupo Quitosana em relação ao grupo controle, no mesmo período. A citocina IL-4 foi quantificada nos dois períodos analisados, apresentando valores semelhantes tanto para 24h quanto para sete dias

quando comparado ao grupo controle (Tabela 6). De acordo com os resultados não foi identificada diferença entre os grupos e entre os tempos.

Tabela 5 – Concentrações das citocinas IFN- γ e IL-4 (pg/mL) no soro de camundongos após 24 horas e 7 dias da injeção de nanopartículas de quitosana.

Grupos	IFN- γ		IL-4	
	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias
Controle	79,1 \pm 3,37	68,8 \pm 11,4	556,4 \pm 184,6	406,4 \pm 35,3
Quitosana	72,3 \pm 10,73	96,4 \pm 18,4	428,1 \pm 68,4	388,1 \pm 67,6

Amostras dosadas em duplicata provenientes de um ensaio. Resultados expressos como a média \pm desvio padrão.

5.3.1.2 Dosagem de IFN- α e IL-4 na cultura de esplenócitos

Nos dois grupos analisados, Controle e Quitosana, a produção de IFN- γ foi baixa. A produção pelo estímulo NQ foi semelhante nos dois grupos para os três tempos, apresentando valor mais alto apenas no grupo Quitosana 120h. Quando comparado aos outros estímulos, pode-se perceber que os valores para o estímulo NQ foram semelhantes aos outros estímulos no grupo Controle. Em 120h a produção apresentou valores maiores para NQ (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentrações de IFN- γ (pg/mL) no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais após diferentes estímulos.

ESTÍMULOS	CONTROLE			QUITOSANA		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h
RPMI	40,6 \pm 0,67	38,7 \pm 0,67	47,3 \pm 2,02	37,7 \pm 4,7	40,7 \pm 0,67	38,7 \pm 0,67
NQ	40,1 \pm 1,35	36,8 \pm 2,02	43,9 \pm 1,36	42,5 \pm 0,67	47,7 \pm 4,04	76,8\pm3,37
LPS	36,8 \pm 0,67	43,9 \pm 1,35	50,6 \pm 6,7	55,4 \pm 1,35	64,4 \pm 3,37	72,5 \pm 25,6
PHA	38,7 \pm 2,02	43,5 \pm 0,67	38,2 \pm 1,35	62 \pm 8,08	36,8 \pm 3,36	43,7 \pm 2,02

Meio de cultura RPMI – controle negativo; NQ - Nanopartícula de Quitosana; LPS - Lipopolissacarídeo; PHA – Fitohemaglutinina. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. O valor em negrito mostra o valor mais alto para NQ.

Pode-se perceber na Tabela 7 que a produção de IL4 desencadeada por NQ no grupo Controle foi semelhante nos três tempos analisados. No entanto, no grupo Quitosana em 72h o valor foi menor que 24h e 120h, porém, os valores foram maiores para NQ no grupo Quitosana nos três tempos analisados em relação ao grupo Controle. No grupo Quitosana 24h, estímulo NQ, a produção foi maior do que para os outros estímulos e em 72h a produção foi similar entre os estímulos. No entanto, em 120h a produção para o estímulo NQ foi mais alta.

Tabela 7 – Concentrações de IL-4 (pg/mL) no sobrenadante da cultura de esplenócitos de animais após diferentes estímulos.

CONTROLE

QUITOSANA

ESTÍMULOS	24h	72h	120h	24h	72h	120h
RPMI	309,2±15,7	281,4±23,6	337±7,9	325,8±7,9	325,9±23,6	348,1±7,9
NQ	364,8±47,1	353,7±15,7	359,2±7,9	481,4±39,3	370,3±7,9	553,7±15,7
LPS	459,2±7,9	387±15,7	481,4±55	331,4±15,7	337±23,6	614,8±23,6
PHA	303,7±39,3	348,1±7,9	409,2±62,8	403,7±55	431,4±47,1	359,2±23,6

Meio de cultura RPMI – controle negativo; NQ - Nanopartícula de Quitosana; LPS - Lipopolissacarídeo; PHA – Fitohemaglutinina. Os resultados expressam a média±desvio padrão. Os valores em negrito mostram que os valores diferiram entre o meio de cultura RPMI e NQ.

6 DISCUSSÃO

As nanopartículas têm sido cada vez mais aplicadas na área médica, podendo ser utilizadas para aumentar o valor terapêutico de fármacos e moléculas bioativas melhorando a sua biodisponibilidade e solubilidade e o seu tempo de retenção (Shenoy & Amiji, 2005). Os parâmetros como tamanho da partícula, distribuição de tamanho e potencial zeta são características importantes das nanopartículas e que tem impacto direto sobre a sua estabilidade física (Mehnert & Mader, 2001). Nesse estudo foram preparadas nanopartículas de quitosana e PLGA vazias e nanopartículas de quitosana marcadas com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com TPP. Todas as preparações foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e morfologia.

Os resultados indicaram que as nanopartículas preparadas apresentaram tamanho menor que 300nm. O que está de acordo com os dados na literatura em que as nanopartículas mesmo preparadas por diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 – 300 nm (Schaffazick et al. 2003). Além de apresentarem valores para distribuição de tamanho menor do que 0,5, indicando que a distribuição de tamanho das nanopartículas foi uniforme, pois, segundo Mohammadpour Dounighi et al. (2012) valores menores que 0,5 indicam a formação de sistemas monodispersos, ou seja, que apresentam alta homogeneidade no tamanho das partículas presentes no meio.

O potencial zeta, que representa a carga de superfície das nanopartículas foi positivo para as nanopartículas de quitosana. Esse valor positivo se deve às cargas catiônicas dos grupamentos amino livres da quitosana que não foram totalmente neutralizadas, indicando que apenas parte desses grupos sofreu neutralização durante a preparação das nanopartículas (Berthold et al.1996). As nanopartículas de PLGA apresentaram potencial zeta negativo. Os valores de potencial zeta negativos são

atribuídos à presença de grupos carboxílicos terminais na superfície das partículas (Govender et al. 1999).

As nanopartículas de quitosana contendo magnética apresentaram o potencial zeta positivo. As nanopartículas de quitosana são carregadas positivamente, enquanto, as nanopartículas magnéticas de maguemita funcionalizadas com TPP utilizadas na preparação das nanopartículas de quitosana magnética são carregadas negativamente, pois o TPP apresenta carga negativa, confirmando assim a presença de grupos amina sobre as partículas. Esse resultado se assemelha ao observado por Shukla et al. (2014) & Arum et al. (2015), que mostraram que nanopartículas de quitosana com magnética apresentaram potencial zeta positivo, confirmando a presença de quitosana na superfície da partícula.

As nanopartículas de PLGA apresentaram a morfologia esférica, semelhante às encontradas por Maji et al. (2014) & Matthaiou et al. (2014). Já as nanopartículas de quitosana apresentaram estrutura reticular semelhante à mostrada por Liu et al. (2007). Ao utilizar o contraste ácido fosfotúngstico que faz contração negativa, na qual o que é amostra fica claro, foi possível observar a presença de estruturas semi esféricas, além de estruturas claras e ao utilizar o contraste tetróxido de ósmio o material apresentou uma cor escura. Assim, a morfologia das nanopartículas de quitosana nesse estudo pode estar relacionada com a repulsão eletrostática existente entre grupos amina ao longo da cadeia e ao agente reticulante. As estruturas semi esféricas pode estar revelando a presença deste contraste, ou seja, resíduos de material. No caso das estruturas claras pode indicar a presença das nanopartículas. Assim, pode-se perceber que os contrastes não foram bons para mostrar o contorno das nanopartículas de quitosana.

As nanopartículas de quitosana contendo magnética apresentaram morfologia visualmente semelhante às nanopartículas magnéticas, no entanto, ao observá-las por microscopia eletrônica de alta resolução foi possível detectar diferença, onde pode-se notar que a quitosana está revestindo a magnética, o que pode ser devido ao fato de as nanopartículas de quitosana formarem uma estrutura reticular. Esse resultado é semelhante ao observado por Osuna et. al (2012). É bem conhecido que os grupos NH_2 nas moléculas de quitosana podem interagir com Fe^{2+} da magnética em solução aquosa (Wu et. al 2009). No caso do presente estudo a quitosana se ligou ao TPP, pois as nanopartículas magnéticas estavam funcionalizadas com este agente reticulante. As ligações químicas estabelecidas entre as duas partes são responsáveis por manter o sistema coeso. A criação de ligações cruzadas na matriz em processo de reticulação

polimérica melhora as suas propriedades mecânicas, além de estabelecer sítios ativos em sua superfície (Bhattarai et al. 2008).

As nanopartículas magnéticas foram utilizadas neste estudo para marcar as nanopartículas de quitosana para se avaliar através da microscopia eletrônica de transmissão a internalização pelos macrófagos. No entanto, as nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana podem ser utilizadas para diversas aplicações biomédicas, tais como processos de separação, imobilização enzimas/ células, (Kavaz et al. 2008), direcionamento e entrega de fármacos e imagem por ressonância magnética. O revestimento com quitosana proporciona-lhe grupos amino e hidroxil livres que permitem a possibilidade de se ligar a grupos químicos e íons (Lopéz et al.2013).

Segundo Rodrigues (2012) devido às propriedades magnéticas das nanopartículas, os magnetolipossomas (lipossomas contendo nanopartículas magnéticas) podem ser localizados num local terapêutico de interesse, usando um campo magnético externo. Esses sistemas foram direcionados para a região tumoral com a ajuda de um campo magnético, aumentando a eficácia de um fármaco anticancerígeno (Zhang et al. 2005). Assim, possivelmente as nanopartículas de quitosana contendo magnéticas preparadas neste estudo podem ser utilizadas com a mesma finalidade dos magnetolipossomas, pois apresentam em sua composição magnética, apresentando então as propriedades de cada uma dessas nanopartículas: quitosana e magnética.

Quando se utiliza nanopartículas em aplicações biomédicas, incluindo polímeros biodegradáveis, a toxicidade é uma preocupação. No presente estudo, a citotoxicidade das nanopartículas de quitosana e de PLGA em diferentes concentrações foi investigada pelo método MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). As nanopartículas na concentração igual ou menor que 2mg/ mL, não afetaram significativamente a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7, o que indica que elas não são tóxicas para estas células, e fundamenta a sua segurança e biocompatibilidade para estudos *in vivo* (Mundargi et al. 2008).

De acordo com a ISO 10993-5 (1999), que regulamenta os métodos para análise de citotoxicidade, o grau de efeito citotóxico é classificado como não citotóxico quando apresentam mais de 75% de viabilidade celular, levemente tóxicos 50-75%, moderadamente citotóxico 25-50% e altamente tóxicos quando menor que 25%. A partir disto, verificou-se que na concentração de 4mg/mL, tanto as nanopartículas de quitosana quanto de PLGA apresentaram uma viabilidade celular abaixo de 75%, consideradas, portanto, nessa concentração, levemente tóxicas. Já nas demais concentrações (2mg/mL,

1mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25mg/mL), a viabilidade celular apresentou-se acima de 75%, contudo, não-citotóxicas.

Por meio do teste de citotoxicidade, observou-se que para as nanopartículas na concentração de 1mg/ mL, a viabilidade foi maior que 80%, sendo a concentração escolhida para análise *in vitro* da função dos macrófagos pela observação da produção de citocinas e, no caso das nanopartículas de quitosana contendo magnética, além da produção de citocinas foi analisada também a atividade fagocítica.

A resposta dos macrófagos às nanopartículas é de especial interesse, pois eles são as primeiras células a interceptá-las após administração *in vivo* (Sayes et al. 2007). A análise da interação entre nanopartículas e macrófagos é importante para o desenvolvimento de estratégias eficientes que possam trazer melhores resultados terapêuticos.

Estudos têm demonstrado que a internalização por macrófagos pode ser dependente da opsonização das nanopartículas por proteínas plasmáticas. De forma geral, ocorre uma intensa opsonização de partículas sem modificações na superfície e, conseqüentemente, a fagocitose, ou seja, a fagocitose pode ser facilitada pela opsonização (Dobrovoskaia et al. 2008; Lin et al. 2010). Nesse estudo, as nanopartículas de quitosana contendo magnética foram incubadas com soro de camundongo antes de serem adicionadas aos macrófagos da linhagem RAW 264.7, para assim, possibilitar a análise da fagocitose dessas nanopartículas quando em contato com opsoninas. As proteínas do soro podem atuar como opsoninas, adsorvendo na superfície das nanopartículas e podendo torná-las alvo da internalização. As nanopartículas de quitosana contendo magnética foram encontradas intracelularmente após 4h e 24h de incubação com os macrófagos. Isso pode ser em decorrência de as nanopartículas estarem aglomeradas, o que pode aumentar a internalização. Assim como por interações entre opsoninas na superfície das nanopartículas e os macrófagos. Além disso, é possível a influência da carga de superfície. Estudos afirmam que a internalização de nanopartículas de quitosana está correlacionado com o seu potencial zeta devido às interações eletrostáticas entre as nanopartículas de quitosana, carregadas positivamente, e a membrana celular carregada negativamente (Jain et al. 2006; Bakhru et al. 2012).

O mecanismo de internalização celular para nanopartículas de quitosana tem sido investigado; no entanto, os pesquisadores não costumam utilizar como modelo os macrófagos. Bakhru et al. (2012) ao avaliar por MET a internalização de nanopartículas de óxido de ferro modificadas com quitosana por células-tronco neurais (NSCs) revelou

que essas nanopartículas foram visíveis dentro da célula em vesículas membranosas. Por sua vez, Shi et al. (2012) ao analisar a interação de osteoblastos com nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosana por MET mostrou que a maioria das nanopartículas foram encontradas fora da célula, ancoradas a membrana celular, demonstrando que elas aderem à membrana dos osteoblastos. Dessa forma percebe-se que a localização das nanopartículas pode ser dependente da linhagem celular. Assim como foi também observado no caso das nanopartículas de quitosana marcadas com FITC, onde Zaki et al. (2011) ao estudar a sua internalização em macrófagos observou que elas estavam localizadas no citoplasma longe do núcleo. No presente trabalho também não foram encontradas nanopartículas no núcleo. No entanto, já foi relatado localização nuclear de nanopartículas de quitosana marcada com FITC em células HeLa (Malatesta et al. 2015).

As citocinas são proteínas produzidas por vários tipos de células, incluindo células do sistema imune em resposta à ativação. Elas desempenham papel importante na homeostase, modulando e regulando a resposta imune (Christian & Hunter, 2012; Elsabahy & Woolwy, 2013). Nesse estudo foram analisadas as citocinas TNF- α , IL12p40 e IL10. A liberação de IL12p40 e IL10 foi baixa após a exposição dos macrófagos às nanopartículas por até 24h, sendo observada a produção da IL12p40 somente em 24h de incubação. No caso do LPS foi observada elevada produção das duas citocinas no período de 24h. No entanto, foi observada alta produção de TNF- α nos dois períodos de exposição, (4h e 24h). O TNF- α é uma citocina multipotente que desempenha papel importante na apoptose, ativação celular, diferenciação e recrutamento de células (Sedgwick et al. 2000), sendo uma citocina com excelente eficácia anticancerígena (Cai et al. 2008). A liberação de TNF- α por macrófagos pode ser utilizada como um indicativo de resposta inflamatória. Macrófagos, segundo Ding et al. (2009), podem liberar citocinas tal como TNF- α com a estimulação de biomateriais em poucas horas. Pode-se perceber que a produção das citocinas foi semelhante para todas as nanopartículas analisadas (quitosana, quitosana contendo magnética e PLGA), mostrando então um perfil inflamatório muito semelhante.

A IL12 e o TNF- α são citocinas pro-inflamatórias, as quais regulam positivamente a resposta inflamatória, sendo responsáveis por ambas as respostas localizada e sistêmica (Anderson et al. 2006). A IL10 por sua vez é uma citocina anti-inflamatória, que regula negativamente a secreção de citocinas (Mege et al. 2006; Taylor

et al. 2006). Dessa forma, sugere-se que o aumento da produção de TNF- α promovido pelas nanopartículas nesse estudo, possa ter sido influenciado pela baixa produção de IL10. Ao analisar os resultados, foi possível observar que os valores das duplicatas da curva apresentaram valores próximos e que ao realizar novos experimentos com os mesmos estímulos possivelmente os resultados serão semelhantes.

Os resultados do presente trabalho se assemelham com os dados encontrados na literatura. Grabowski et al. (2015) sintetizou nanopartículas de PLGA e de PLGA/Quitossana e avaliou a secreção de TNF- α nas concentrações de 0,1mg/mL e 1mg/mL e não observou a sua produção em baixas concentrações, mas à 1mg/mL detectou altas concentrações de TNF- α . Ao avaliar a influência de quitossana-carboximetil, em diferentes concentrações, na secreção de citocinas por macrófagos, (Sikai et al.2011) mostrou que a produção de TNF- α foi significativamente promovida nas concentrações de 1mg/mL assim como de 100 e 500 μ g/mL. Wu et al. (2015) também avaliou e demonstrou que a quitossana induz um aumento nos níveis dessa citocina.

As nanopartículas de quitossana contendo magnéticas apresentaram altos valores para TNF- α e uma baixa produção de IL12p40 e IL10 assim como foi observado para outras nanopartículas testadas, mostrando portanto, atividade inflamatória. Chattopadhyay et al. (2014) mostrou que células Jurkat expostas às nanopartículas de óxido de cobalto revestidas com quitossana causam aumento dos níveis de TNF- α e redução nos níveis de IL10. Não foram encontrados relatos na literatura de produção de citocinas por macrófagos desencadeada por nanopartículas de quitossana com magnéticas (maguemita).

Os resultados do presente estudo mostram que a internalização de nanopartículas de quitossana contendo magnética por macrófagos influenciaram a sua atividade inflamatória. Pode-se observar que a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α foi induzida nos dois períodos em que as nanopartículas foram internalizadas.

As nanopartículas que ativam o sistema imunológico podem ser utilizadas como vacinas ou adjuvantes (Jiao et al.2014). As nanopartículas de quitossana além de apresentarem propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e mucoadesividade, podem ser consideradas boas adjuvantes (Tiyabonchai, 2003). Essas nanopartículas desempenham atividade imuno-estimulante tais como aumentar a migração e ativação de macrófagos, promover a resistência a infecções por microrganismos e indução da produção de citocinas (Van der Lubben et al.2001).

As nanopartículas de quitosana, segundo Wen et al. (2011) tem um forte potencial para aumentar tanto a resposta imune celular quanto a humoral e induzir uma resposta balanceada Th1/ Th2 podendo ser um adjuvante seguro e eficaz apropriado para um amplo espectro de vacinas profiláticas e terapêuticas. Para avaliar as citocinas derivadas de células Th envolvidas na atividade de nanopartículas de quitosana, foram analisados perfis de secreção de citocinas, o IFN- γ de perfil Th1 e IL-4 de perfil Th2, no soro e no sobrenadante da cultura de esplenócitos provenientes de camundongos Balb/C que receberam uma injeção de nanopartículas de quitosana. Na avaliação a partir da cultura de esplenócitos, esses foram reestimulados *in vitro* com nanopartículas de quitosana, LPS e PHA.

Apesar de não ter sido realizado o teste estatístico, para verificar a diferença significativa tanto entre o grupo Controle quanto o Quitosana assim como entre os estímulos, no caso da cultura de esplenócitos, pois, os resultados são provenientes de um único experimento, foi possível observar tanto a produção de IFN- γ quanto de IL-4 no soro e para todos os estímulos analisados, porém a produção de IL-4 foi maior que a de IFN- γ . A produção de IFN- γ desencadeada pelo estímulo NQ foi maior em 120h de incubação. No caso da IL-4 em 120h NQ desencadeou uma alta produção e nos três tempos analisados a produção para NQ foi maior no grupo Quitosana do que no grupo Controle. A baixa produção de IFN- γ pode estar relacionada com a citocina IL-10 que como já foi mencionado antes nesse trabalho é uma citocina que inibe a produção de outras citocinas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que os métodos de preparação de nanopartículas de quitosana, quitosana contendo magnética e PLGA, gelificação iônica e emulsificação e evaporação do solvente, respectivamente, podem ser usados para incorporar fármacos e no caso das nanopartículas magnéticas, essas podem marcar as nanopartículas de quitosana para se avaliar através da microscopia eletrônica de transmissão a internalização por macrófagos.

As nanopartículas de quitosana e nanopartículas de PLGA afetaram a viabilidade de macrófagos *in vitro* apenas na maior concentração testada (4mg/mL).

As nanopartículas de quitosana, quitosana contendo magnética e de PLGA desencadeiam uma alta produção de TNF- α .

As nanopartículas de quitosana magnética são internalizadas por macrófagos *in vitro* em 4h e 24h de incubação, sendo encontradas também próxima aos prolongamentos dos macrófagos em 2h de incubação;

No soro e em sobrenadante da cultura de esplenócitos foi observada tanto a produção de IFN- γ e IL-4, porém a produção de IL-4 foi maior.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, Rio de Janeiro, 2008.

Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*. 61:428-37, 2009.

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro - and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* 100:5-28, 2004.

Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Suárez AIT, Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release* 79:29-40, 2002.

Alexis F, Pridgen F, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm* 5: 505-515, 2008.

Al- Hallak MH, Sarfraz MK, Azarmi S et al. Microcalorimetric Method to Assess Phagocytosis: Macrophage-Nanoparticle Interactions. *The AAPS Journal* 13(1): 20-9, 2011.

Amaral AC, Marques AF, Muñoz JE, et al. Poly (lactic acid-glycolic acid) nanoparticles markedly improve immunological protection provided by peptide P10 against murine paracoccidiodomycosis. *Br J Pharmacol*, 159:1126-32, 2010.

Anderson EJ, McGrath MA, Thalhamer T et al. Interleukin-12 to interleukin ‘infinity’: the rationale for future therapeutic cytokine targeting. *Springer semin Immunopathol* 27: 425–442, 2006.

Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 23:27-34, 2007.

Balasubramanian J, Sravanthi T, Sujitha V. Ruminative Announcement on Nanoparticles and Mononuclear Phagocytic System. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 7: 129-137, 2015.

Beduneau A, Ma Z, Grotepas CB, Kabanov A, Rabinow BE, Gong N, Mosley RL, Dou H, Boska MD, Gendelman HE. Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. *PLoS One* 4(2):e4343, 2009.

Calvo P, Remunán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci* 63:125-132, 1997.

Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev* 41:2718-39, 2012.

Caruthers SD, Wickiline AS, Lanza GM. Nanotechnological applications in medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 26-30, 2007.

Chattopadhyay S, Dash SK, Kar Mahapatra S, Tripathy S, Ghosh T, Das B, Das D, Pramanik P, Roy S. Chitosan-modified cobalt oxide nanoparticles stimulate TNF- α -mediated apoptosis in human leukemic cells. *J Biol Inorg Chem*.19(3):399-414, 2014.

Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials* 26:7260-75, 2005.

Chung EY, Kim SJ, Ma XJ. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res*. 16:154-61, 2006.

Commandeur S, van Beusekom HM, van der Giessen WJ. Polymers, drug release, and drug-eluting stents. *J Interv Cardiol* 19: 500-6, 2006.

Cornillault J. Particle Size Analyzer. *Applied Optics*, 11: 265-265, 1972.

Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical Research* 23:1417-1450, 2006.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112:935-45, 2008.

Dash M, Chiellini F, Ottenbriteb RM, Chiellini E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical. *Progress in Polymer Science* 36: 981-1014, 2011.

Delie F, Blanco-Príeto MJ. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* 10: 65-80, 2005.

Delves PJ, Roitt IM. Advances in immunology: The immune system. *The New England Journal of Medicine* 343:37-49, 2000.

Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2: 469-478, 2007.

Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm* 5: 487-95, 2008.

Elsabahy, M.; wooley, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society reviews* 41.7: 2545–2561, 2012.

Felipe MSS, Amaral AC. Nanomedicina – Importantes inovações para o tratamento de doenças fúngicas. *Microbiologia in Foco* 3: 10-15, 2008.

Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27: 796-810, 2010.

Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release* 126:187-204, 2008.

Gaucher G, Asahina K, Wang J, Leroux JC. Effect of Poly (*N*-vinyl-pyrrolidone)-*block*-poly (D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles. *Biomacromolecules* 9;10(2):408-16, 2009.

George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release* 114:1-14, 2006.

Goldburg WI. Dynamic light scattering. *American Journal of Physics*, 67: 1152-1160, 1999.

Gonçalves RM, Pereira ACL, Pereira IO, Oliveira MJ, Barbosa MA. Macrophage response to chitosan/poly-(γ -glutamic acid) nanoparticles carrying an anti-inflammatory drug. *J Mater Sci: Mater Med* 26:167, 2015.

GRABOWSKI N, Hillaireau H, Vergnaud J, Tsapis N, Pllardy M, Romer SK, Fattal E. Surface coating mediates the toxicity of polymeric nanoparticles towards human-like macrophages. *Int J Pharm* 482(1–2): 75–83, 2015.

Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nanoparticulate PLGA cancer vaccine formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 943-955, 2011.

Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater* 6: 319-327, 2002.

Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 66:2873-96, 2009.

Hillery AM, Lloyd AW, Swarbrich J. *Drug Delivery and Targeting: for pharmacists and pharmaceutical scientists*. Ed. Taylor e Francis, Londres, 2001.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO; 1999.

Issa B, Obaidat IM, Albiss BA, Haik Y. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int J Mol Sci* 14(11):21266-305, 2013.

Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract* 17: 89-101, 2008.

Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) PLGA devices. *Biomaterials* 21: 2475-2490, 2000.

Janes KA, Alonso MJ. Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science* 88: 2769–2776, 2003.

Julienne, M. C. et al. Preparation of Poly(dl-lactide/glycolide) Nanoparticles of Controlled Particle Size Distribution: Application of Experimental Design. *Drug Dev. Ind. Pharm.*,18, 1063 (1992).

Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *N Engl J Med.* 16;363(25):2434-43, 2010.

Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of pharmaceutical sciences* 8:1-10, 2013.

Laranjeira MCM, Fávere VTD. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. *Química Nova* 32: 672-678, 2009.

Li X, Min M, Du N, Ying Gu, Hode T, Naylor M, Chen D, Nordquist RE, Wei R. Chen WR. Chitin, Chitosan, and Glycated Chitosan Regulate Immune Responses: The Novel Adjuvants for Cancer Vaccine. *Clinical and Developmental Immunology* 2013:387023, 2013.

Li Y, Kroger M, Liu WK. Endocytosis of PEGylated nanoparticles accompanied by structural and free energy changes of the grafted polyethylene glycol. *Biomaterials* 35: 8467-78, 2014.

Liao DL, Wub GS, Liao BQ. Zeta potential of shape-controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 348: 270–275, 2009.

Liu L, Bai Y, Song C, Zhu D, Song L, Zhang H, Dong X, Leng X. The impact of arginine-modified chitosan-DNA nanoparticles on the function of macrophages. *J Nanopart Res* 12:1637-1644, 2010.

Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)* 3:1377-1397, 2011.

Malatesta M, Grecchi S, Chiesa E, Cisterna B, Costanzo M, Zancanaro C. Internalized Chitosan Nanoparticles Persist for Long Time in Cultured Cells. *European Journal of Histochemistry* 59 (1), 2015.

Malvern Instruments Zetasizer Nano User Manual, Worcestershire, 2007.

Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles-Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47:165-196, 2001.

Mege JL, Meghari S, Honstetter A et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 6: 557–569, 2006.

Melo CS, Silva-Cunha A, Fialho SL. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 33: 469-477, 2012.

Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21: 2335-2346, 2000.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53: 283-318, 2001.

Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein binding properties. *Prog. Lipid. Res.* 42: 463-478, 2003.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 19: 311-30, 2005.

Mohammadpour Dounighi N, Eskandari R, Avadi MR, Zolfagharian H, Sadeghi MMA, Rezayat M. Preparation and *in vitro* characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *J Venom Anim Toxins* 18: 44-52, 2012.

Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5: 561-573, 2006.

Motta AC, Duek EAR. Síntese, caracterização e degradação "*in vitro*" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Revista Matéria* 11: 340-350, 2006.

Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 125:193-209, 2008.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723-37, 2011.

Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 166: 182–194, 2013.

Nahar M, Dutta T, Murugesan S, Asthana A, Mishra D, Rajkumar V, Tare M, Saraf S, Jain NK. Functional polymeric nanoparticles: an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 23:259-318, 2006.

Neves ALP, Milioli CC, Müller L, Riell HG, Kuhnen NC, Stulzerb HK. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 445: 34-39, 2014.

Nicolette R., Dos Santos DF, Faccioli LH. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *International Immunopharmacology* 11: 1557–1563, 2011.

Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine* 1: 51-63, 2014.

Owens DE 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 307:93-102, 2006.

Panariti A, Misericocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl* 5: 87-100, 2012.

Prabaharan M. Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials for Controlled Drug Delivery. *J Biomater Appl* 23: 5-36, 2008.

Pelizon AC, Denadai B, Schiavon EV, Martins DR, Zorzella SFG, Sartori A. Produção deficiente de citocinas Th1 em camundongos BALB/c jovens. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl* 28:171-176, 2007.

Pimentel LF, Jácome-Junior AT, Mosqueira VCF, Santos-Magalhães NS. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 43: 503-514, 2007.

Pirasa AM, Maisetta G, Sandreschia S, Esinb S, Gazzarria M, Batonib G, Chiellinia F. Preparation, physical–chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. *Int J Biol Macromol* 67:124-31, 2014.

Pondman KM, Sim RB, kishore U. Interaction of the system with nanoparticles. *Encyclopedia of Nanotechnology* 1-8, 2015.

Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2:8-21, 2006.

Réus M, Carmignan F, Lemos Senna E, Machado de Campos A. Nanopartículas Poliméricas na Administração Tópica Ocular de Fármacos. *Lat. Am. J. Pharm* 28: 125-32, 2009.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications . *Prog. Polym. Sci* 31: 603–632, 2006.

Roberts RA, Shen T, Allen IC, Hasan W, DeSimone JM, Ting JP. Analysis of the murine immune response to pulmonary delivery of precisely fabricated nano- and microscale particles. *PLoS One* 8: e62115, 2013.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83-93, 1994.

Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release* 145:182-95, 2010.

Santos JE, Soares JP, Dockal ER, Campana-Filho SP, Cavalheiro ETG. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 13: 242-249, 2003.

Santos-Magalhães NS, Pontes A, Pereira VM, Caetano MN. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm* 208: 71-80, 2000.

Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to *in vivo* pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 97:163–180, 2007.

Schaffazick RS, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann ARC. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova* 26: 726-737, 2003.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-89, 2004.

Sedlik, C. Th1 and Th2 subsets of T lymphocytes: Characteristics, physiological role and regulation. *Bull. Inst. Pasteur* 94, 173-200, 1996.

Severino P, Vasconcellos FC, Figueiredo ES. Uso tópico de quitosana em oftalmologia. *Rev. Bras. Farm* 88: 155-158, 2007.

Seth A, Ritchie FK, Wibowo N, Lua LHL, Middelberg APJ. Non-carrier nanoparticles adjuvant modular protein vaccine in a particle-dependent manner. *PLoS ONE* 10(3): e0117203, 2015.

Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon Y. Food applications of chitin and chitosans. *Food Science e Technology* 10: 37-51, 1999.

Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Yongping SU; Cheng T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, 133: 185-192, 2006.

Shi SF, Jia JF, Guo XK, Zhao YP, Chen DS, Guo YY, Cheng T, Zhang XL. Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells. *Int J Nanomedicine* 7:5593-602, 2012.

Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol* 61:216-20, 2004.

Silva HSRC, Santos KSCR, Ferreira EI. Quitosana: derivados Hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova* 29: 776-785, 2006.

Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86: 215-23, 2009.

Singh RP, Jhamb SS, Singh PP. Effects of morphine during Mycobacterium tuberculosis H37Rv infection in mice. *Life Sci* 82: 308-314, 2008.

Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *BLOOD* 99:4283-97, 2002.

Spin-neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio, RAC; Marcantonio-júnior E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP* 37: 155-161, 2008.

Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 17;60(11):1252-65, 2008.

Taylor A, Verhagen J, Blaser K et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 117:433-442, 2006.

Thasneem YM, Sajeesh S, Sharma CP. Effect of thiol functionalization on the hemocompatibility of PLGA nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* 99:607-17, 2011.

Tiyaboonchai W. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal* 11: 51-66, 2003.

Van der Lubben IM., Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev* 52:139-144, 2001.

Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar VD. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Current Nanoscience* 1: 47-64, 2005.

Wen ZS, Xu YL, Zou XT, Xu ZR. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Marine Drugs* 9:1038-55, 2011.

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496: 445–455, 2013.

Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF- α and nitric oxide from macrophages via IFN- γ induction. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 897-902, 2000.

Yang CH, Huang KS, Lin PW, Lin YC. Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticle. *Sensors and actuators B1* 24: 510-516, 2007.

Yih TC, Al-Fandi M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem* 97: 1184-90, 2006.

Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schlom J, John W. Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 25: 2085-2094., 2007.

Zahr AS, Davis CA, Pishko MV. Macrophage Uptake of Core-Shell Nanoparticles Surface Modified with Poly(ethylene glycol). *Langmuir* 22: 8178-8185, 2006.

Zaki NM, Nasti A, Tirelli N. Nanocarriers for Cytoplasmic Delivery: Cellular Uptake and Intracellular Fate of Chitosan and Hyaluronic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles in a Phagocytic Cell Model. *Macromol. Biosci.* 11: 1747–1760, 2011.

ZHANG J.Q.; ZHANG, Z.R.; YANG, H. ; TAN, Q.Y. ; QIN, S.R. ; QIU, X.L. Lyophilized Paclitaxel Magnetoliposomes as a Potencial Drug Delivery System for Breast Carcinoma via Parenteral Administration: In Vitro and In Vivo Studies. *Pharmaceutical Research* 22: 573-583, 2005.

Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 151: 458-65, 2010.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

Anexo 2 – Outros Anexos

Anexo 3 – Outros anexos