

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

JONATHANN CORRÊA POSSATO

**AVALIAÇÃO DO USO NANOPARTICULAS DE OURO E LIPOSSOMAS
COMO ADJUVANTE PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS
POLICLONAIS**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2022

JONATHANN CORRÊA POSSATO

**AVALIAÇÃO DO USO NANOPARTICULAS DE OURO E LIPOSSOMAS
COMO ADJUVANTE PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS
POLICLONAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para o exame de qualificação
de doutorado em ciências da saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez
Machado de Ávila
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre G. Dal-
Bó

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2022.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P856a Possato, Jonathann Corrêa.

Avaliação do uso nanopartículas de ouro e lipossomas como adjuvante para a produção de anticorpos policlonais / Jonathann Corrêa Possato. - 2022.

60 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

Coorientação: Alexandre G. Dal-Bó.

1. Imunologia. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Lipossomas. 4. Formação de anticorpos. 5. Materiais nanoestruturados. 6. Proteína Hipotética da Leishmania. I. Título.

CDD 23. ed. 616.079

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).



unesc

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pelo candidato **JONATHANN CORRÊA POSSATO**, sob o título “**AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E LIPOSSOMAS COMO ADJUVANTES PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 29 de setembro de 2022.

Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Relator – UNESC

Prof. Dr. PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Membro Interno – UNESC

Prof. Dr. MIGUEL ANGEL CHÁVEZ FUMAGALLI
Membro Externo – Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Peru.

Prof. Dra. JADE DE OLIVEIRA
Membro Externo – UFRGS

Prof. Dr. Ricardo A. Machado de Ávila
Orientador

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, pela orientação e pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao coorientador, Prof. Dr. Alexandre G. Dal-Bó, por se disponibilizar com tempo e recursos para a realização dos experimentos deste trabalho.

À todos os colegas de laboratório, que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Gostaria também aqui prestar agradecimento as instituições de fomento CAPES, FAPESC e CNPq.

RESUMO

A aplicação da nanotecnologia na pesquisa é considerada interdisciplinar, uma vez que engloba diversas áreas do conhecimento científico e em materiais, como nanopartículas, nanotubos e nanofibrilas. As nanopartículas metálicas como a de ouro são amplamente aplicadas na área da saúde, por sua preparação simples e por suas propriedades imunológicas. Já nanopartículas lipídicas, como lipossomas também são utilizados na área da saúde, sendo empregadas principalmente como biotransportadores na entrega do fármaco diminuindo a toxicidade dele. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a produção de anticorpos em camundongos quando imunizados com proteína hipotética da leishmania (LiHyA) associado às nanopartículas de ouro (NPAu) e lipossomas. Iniciamos os experimentos realizando a síntese dos nanomateriais seguido de sua caracterização, após adicionamos proteína LiHyA e imunizamos os animais uma vez por semana durante 6 semanas, sendo que avaliamos mensalmente durante o tempo de 5 meses após a última imunização. Após todas as imunizações foi realizado dosagens bioquímicas e título de anticorpos IgG. Nossos resultados demonstraram que nanomateriais a curto prazo são capazes de produzir nível de anticorpos igual a adjuvante a base de alumínio, sem nenhum efeito tóxico celular. Além disso, nanomateriais conseguem manter níveis mais altos de anticorpos durante um período mais longo, em comparação com adjuvante a base de alumínio. Tais resultados demonstram que os nanomateriais podem estar induzindo uma produção de anticorpos por longo período e sem efeitos tóxicos celulares em relação com adjuvantes a base de alumínio.

Palavras Chaves: NPAu; Imunização; Lipossoma; anticorpos, ELISA.

ABSTRACT

The application of nanotechnology in research is considered interdisciplinary, since it encompasses several areas of scientific knowledge and materials, such as nanoparticles, nanotubes and nanofibrils. Metallic nanoparticles such as gold are widely applied in the health area, due to their simple preparation and immunological properties. Lipid nanoparticles, such as liposomes, are also used in the health area, being mainly used as a biocarrier in drug delivery, reducing its toxicity. Therefore, the present study aims to evaluate the production of antibodies in mice when immunized with LiHyA associated with NPAu and liposomes. We started the experiments by performing the synthesis of nanomaterials followed by their characterization, after adding LiHyA protein and immunizing the animals once a week for 6 weeks, being evaluated monthly during the time 5 months after the last immunization. After performing all immunizations, biochemical measurements and IgG antibody titers were performed. Our results demonstrated that short-term nanomaterials are capable of producing antibody titers equal to aluminum-based adjuvants, without any cellular toxic effects. In addition, nanomaterials are able to maintain higher levels of antibodies for a longer period, compared to aluminum-based adjuvants. Such results demonstrate that such nanomaterials can be inducing a production of antibodies for a long period and without cellular toxic effects in relation to aluminum-based adjuvants.

Keywords: Gold nanoparticles; Immunization; Peptide; Liposome; antibodies, ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração da apresentação do antígeno e resposta imunológica.....	11
Figura 2 – Fluxograma demonstrativo dos tipos de nanomateriais.....	17
Figura 3 – Efeito da administração de NP Au associados a proteína LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss.....	31
Figura 4 – Efeito a longo prazo após a administração de NP Au associados a proteína LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss.....	32
Figura 5 – Efeito da administração de lipossoma associados a LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss.....	34
Figura 6 – Efeito a longo prazo após a administração de lipossoma associados a LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss.....	35
Figura 7 – Avaliação do dano oxidativo causado por 6 imunizações com diferentes adjuvantes por via subcutânea em camundongos swiss em diferentes tecidos.....	37
Figura 8 – Avaliação do dano oxidativo causado por 6 imunizações com diferentes adjuvantes por via subcutânea em camundongos swiss em diferentes tecidos, sendo 2, 3, 4 e 5 meses após a primeira imunização.....	39
Figura 9 – Avaliação dos níveis de oxidantes, através da técnica de DCFH, após a administração dos nanomateriais associados a LiHyA diferentes tecidos de camundongos swiss.....	41
Figura 10 – Efeito a longo prazo após a última administração dos nanomateriais associados a LiHy no nível do sistema oxidante em camundongos swiss.....	42
Figura 11 – Avaliação da atividade da enzima SOD após a administração dos nanomateriais associados a LiHyA, nos diferentes tecidos em camundongos swiss...	43
Figura 12 – Efeito a longo prazo após a última administração dos nanomateriais associados a LiHyA no nível do sistema antioxidante em camundongos swiss.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

NPAu – Nanopartículas de ouro

Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio

TNF – α – Fator de necrose tumoral

IL - 1 β – Interleucina 1 beta

LiHyA – Proteína Hipotética da Leishmania

MHC I – Complexo de Histocompatibilidade Classe I

MHC II – Complexo de Histocompatibilidade Classe II

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

HAuCl₄ – Ácido tetracloraurico

DLS – Dispersão de luz dinâmica

DCFH – Diclorofluoresceína

SOD – Superóxido Dismutase

IgG – Imunoglobulina G

Th1 – Células T helper 1

Th2 – Células T helper 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 IMUNOLOGIA	13
1.2 IMUNIZAÇÃO	15
1.3 ADJUVANTE	17
1.4 NANOTECNOLOGIA.....	19
1.4.1 Nanopartículas de ouro	20
1.4.2 Lipossomas	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	26
3.2 TÉCNICAS LABORATORIAIS	26
3.2.1 Síntese das nanopartículas de ouro (NPAu)	26
3.2.2 Síntese de Lipossomas	26
3.2.3 Caracterização das NPAu e Lipossomas	27
3.2.3.1 Espectroscopia de Ultravioleta-visível	27
3.2.3.2 Espalhamento de luz eletroforético (ELS)	27
3.3 ASSOCIAÇÃO DA LiHyA COM NANOMATERIAIS	27
3.3.2 Caracterização da associação da nanomaterial com a proteína	28
3.4 GRUPOS.....	28
3.5 IMUNIZAÇÃO	29
3.6 TÉCNICA DE ELISA	29
3.10 DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DE ERO.....	30
3.11 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS	30
3.12 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	31
3.13 CONTEÚDOS DE PROTEÍNAS.....	31
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	32
4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	32
4.3 DANO TECIDUAL	38

4.4 ESPECIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	42
4.5 DEFESA ANTIOXIDANTE.....	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMUNOLOGIA

A imunologia é uma ciência relativamente nova e sua origem costuma ser atribuída a Edward Jenner. No fim do século XVIII, ele observou que a doença da varíola bovina, prevê potenciais efeitos protetores contra a varíola humana, que normalmente apresentava alto índice de mortalidade. Em 1796, foi demonstrado por ele que a inoculação da varíola bovina poderia causar uma proteção contra a varíola humana, sendo este termo nomeado de vacinação, e que até hoje em dia é conhecido (Murphy; Travers; Walport, 2007).

Apenas no século XIX, Robert Koch comprovou que microrganismos patogênicos causavam doenças infecciosas. Atualmente, são conhecidas quatro grandes categorias de patógenos, sendo eles, os vírus, as bactérias, os fungos e os parasitas. O sistema imunológico é responsável pela defesa contra essas infecções, através do reconhecimento de antígenos potencialmente patogênicos, seguindo a resposta por duas linhas de defesa, imunidade inata e imunidade adaptativa (Murphy; Travers; Walport, 2007).

A imunidade inata representa a primeira resposta do corpo humano contra um antígeno ou substância estranha, mediada por células fagocitárias, sistema complemento e barreiras naturais (Turvey & Broide, 2010). A resposta imune adaptativa é mais lenta quando comparada com a imunidade inata, e é mediada por linfócitos-B e T. Além disso, tem memória contra antígeno e nesta resposta ocorre produção de anticorpos (Bonilla & Oettgen, 2010).

Na imunologia moderna, Paul Ehrlich investigou a formação de anticorpos, que foram posteriormente reconhecidos como proteínas capazes de inativar agentes infecciosos. Vários pesquisadores seguiram os estudos sobre anticorpos, como Karl Landsteiner, Felix Haurowitz, Niels Jerne entre outros. O pesquisador MacFarlane Burnett propôs a "teoria da seleção clonal". Nesta teoria afirma que cada célula-B produz um tipo de anticorpo e, uma vez ativada, expande e produz células de memória (Taylor, 2014).

A produção de anticorpos contra determinado patógeno ocorre após a identificação do antígeno pelas células do sistema imune. O sistema imunológico humano possui receptores padrões de reconhecimento, que são capazes de

detectar e reconhecer patógenos invasores. Tais receptores são expressos em células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas e macrófagos (Skwarczynski, 2018).

Conforme demonstrado na figura 1, as células detectam os antígenos via fagocitose ou endocitose mediada por receptor. O antígeno após ser fagocitado é digerido no endossomo e os fragmentos peptídicos do antígeno são apresentados aos linfócitos-T via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) Classe I e II. A apresentação nos complexos desencadeia uma cascata sinalizatória para as respostas humoral e celular, sendo que na humoral ocorre a produção de anticorpos e no celular, a ativação de célula-T citotóxica (Institute of Medicine and National Research Council, 1985; Nevagi; Toth; Skwarczynski, 2018).

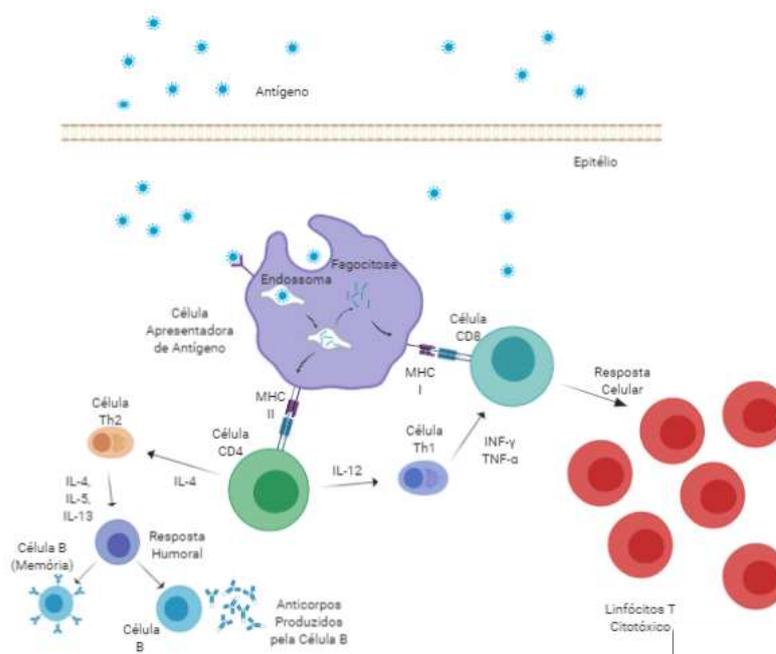


Figura 1 - Ilustração da apresentação do antígeno e resposta imunológica. Após o antígeno ultrapassar a primeira linha de defesa, células apresentadoras de antígeno realizam a fagocitose deste antígeno, fragmentando em pequenos peptídeos que serão expressos via complexo MHC. Nesta interação do complexo com fragmento peptídico do antígeno, a interação com célula CD8, irá estimular resposta celular via linfócitos-T citotóxicos, e/ou interação com células CD4, que podem gerar tanto uma estimulação de células Th1 via liberação de interleucina-12, bem como geram estimulação células Th2, via liberação de interleucina-4, estimulando a resposta humoral e a produção de anticorpos.

Fonte: Produção do próprio autor.

A ativação da resposta imune celular ocorre via estimulação das células Th1, que vão liberar citocinas que impulsionam respostas mediadas por células, ativando fagócitos mononucleares, natural killer, linfócito-T citotóxico, para neutralizar o antígeno/patógeno. Os linfócitos-T citotóxicos neutralizam as células alvo do hospedeiro pelo reconhecimento peptídeos citosólicos estranhos da célula alvo no

contexto do hospedeiro MHC classe I. Após reconhecimento a ativação da morte celular por apoptose, sendo este processo mediado pela liberação de grânulos que tem como conteúdo granzimas e perforina.

Diferente da resposta imune celular a resposta humoral ocorre via estimulação das células Th2, que vão liberar citocinas que ativam a resposta mediada por linfócitos-B, aumentando a produção de anticorpos. Após ativação dos linfócitos-B, teremos 2 vias, primeira na qual se tornam plasmócitos secretando anticorpos de baixa afinidade, ou entram na segunda em um folicular para estabelecer centro germinativo.

A intensa investigação de mecanismos imunológicos nos coloca a compreender os processos envolvidos na identificação e eliminação de patógenos do corpo humano e no estabelecimento de memória imune para responder a futuras exposições. Tais informações têm implicações no desenvolvimento de estratégias de imunização, permitindo a identificação de imunógenos específicos capazes de estimular respostas imunes que levam à proteção (Di Pasquale et al., 2015).

1.2 IMUNIZAÇÃO

A imunização é o processo pelo qual uma pessoa se torna imune ou resistente a uma doença infecciosa, geralmente pela administração de uma vacina. As vacinas estimulam o próprio sistema imunológico do corpo para proteger a pessoa contra infecções ou doenças subsequentes (WHO, 2019).

O reconhecimento de um patógeno desencadeia uma série e complexa cadeia de eventos, os quais incluem a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas e citocinas, ativação do sistema complemento e recrutamento celular. Estes eventos imunológicos geram sinais e sintomas de inflamação no indivíduo. O antígeno captado pelas células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, é processado, e migram para a região das células-T do linfonodo, onde ocorre a ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (Di Pasquale et al., 2015).

A resposta imune adaptativa é mediada por células-T e células-B, sendo que estes determinam o tipo de resposta imune gerada em resposta à infecção. Ao reconhecer um antígeno específico, as células-B se diferenciam em células

plasmáticas e produzem e liberam anticorpos específicos na circulação. Este reconhecimento ocorre com auxílio das células-T CD4⁺. As células-T auxiliares ativadas liberam mediadores inflamatórios que são específicos a uma subpopulação de células T-auxiliares (Garlapati, 2012; Luckheeram et al., 2012).

Grande parte dos antígenos oferece diversos epítomos que induzem a diferenciação das células-B, sendo que cada linhagem de clones derivados de uma célula-B reconhece um determinado epítomo específico. Cada linhagem irá produzir anticorpo gerando uma mistura heterógena de anticorpos, sendo uma específica para um determinado epítomo do antígeno. A produção de anticorpos policlonais tem vantagens para organismo *in vivo*, pois facilita a neutralização do antígeno (Bonilha et al., 2010).

A produção de anticorpos policlonais ocorre também imunizando o animal com antígeno neutralizado ou amenizado, em condições de pesquisa ou fabricação controlada. Os animais utilizados podem variar de espécies entre camundongos, ratos, porquinhos-da-índia, coelhos, cabras e cavalos. A avaliação para a escolha do animal a ser utilizado depende de alguns fatores, como a disponibilidade do animal, custo e volume de soro que se necessita obter (Bean, 2000). Após a escolha da espécie do animal, o procedimento de imunização deve ser realizado. Passado o período da imunização, é realizado a coleta do sangue e separação do soro, onde está a fração de anticorpos policlonais (Bean, 2000; Leenaars; Hendriksen, 2005).

Ainda teremos as células-T citotóxicas CD8⁺ ativadas, que podem matar células diretamente ou através da liberação de citotoxinas. Atualmente, sugere-se que as células apresentadoras de antígeno desempenham um papel intermediário chave entre as respostas inatas e adaptativas e determinam a direção da resposta imune adaptativa (Moser; Leo, 2010).

A imunização ideal, portanto, iniciaria uma resposta imune inata capaz de direcionar a resposta imune adaptativa à inativação eficiente, no caso de uma posterior exposição ao patógeno, e à remoção deste patógeno específico, seguida pelo desenvolvimento da memória imune. A capacidade limitada de vacinas altamente purificadas para induzir imunidade protetora parece estar relacionada ao seu fracasso em induzir a maturação das células apresentadoras de antígeno (Moser; Leo, 2010).

Tais respostas imunológicas são derivadas de epítomos encontrados nos patógenos. Os epitomos são fragmento do antígeno que tem potencial de gerar

resposta imune, e após o reconhecimento e fagocitose, são fragmentados e expressos.

1.3 ADJUVANTE

Os adjuvantes são substâncias que melhoram a potência e qualidade da resposta imunológica contra o antígeno e são usadas em associação, com intuito de ativar sistema imune (Hackett; Ham, 2006). A descoberta do efeito do adjuvante foi casual, quando o veterinário Gaston Ramon observou que o rendimento de um antissoro produzido em cavalo contra patógenos de tétano e difteria era maior em animais que tinham um abscesso no local da injeção.

Adjuvantes tendem a melhorar a resposta imunológicas, em alguns casos, tal melhoria pode ocorrer devido: (1) recrutamento de células imunes; (2) facilitar a absorção dos antígenos pelas células apresentadoras; (3) ativação das células imunes inatas. Tais aspectos geram liberação de citocinas e quimiocinas, provendo o recrutamento de linfócitos-T especializados, como Th1 e Th2, com apresentação dos antígenos MHC-I e ou MHC-II, resultando em uma resposta humoral e celular melhor contra o patógeno (Di Pasquale et al., 2015).

Os adjuvantes a base de sais de alumínio foram usados em humanos pela primeira vez em 1932 e foram os únicos adjuvantes aprovados para uso e licenciado por aproximadamente 70 anos (Di Pasquale et al., 2015). Atualmente já está bem estabelecido os adjuvantes a base de alumínio, como o Alúmen ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) e seus derivados, entre muitos outros em fase de teste clínico para uso em humanos.

As interações dos adjuvantes a base de alumínio já são descritas, Rimaniol et al., investigou tais interações e observaram que macrófagos com hidróxido de alumínio exibiam mudanças em seu fenótipo e função. As alterações de fenótipo observadas são semelhantes à de células dendríticas, eles também podem induzir respostas imunológicas de memória específica de antígeno tipo MHC de classe II. Tais resultados mostram que os macrófagos são sensíveis às vacinas com adjuvantes a base de alumínio (Rimaniol et al., 2004).

Os adjuvantes de sais de alumínio ligam-se a antígeno por meio de forças eletrostáticas, proporcionando um efeito de vida relativamente curta com títulos de anticorpos de pico em 3 a 4 semanas após a injeção (Altman e Dixon, 1989). Os adjuvantes de alumínio também exibem algumas propriedades imunomoduladoras,

induzindo a secreção de quimiocinas por monócitos e macrófagos humanos (Seubert et al., 2008; Kool et al., 2008) em camundongos.

A ação dos adjuvantes de alumínio tende a promover uma resposta quase que exclusiva do tipo Th2, sendo que a ativação da via imune Th1 e consequentemente de linfócitos-T citotóxicos é baixa ou nula. (Lindblad, 2004; Reed et al., 2009). Embora continuem sendo utilizados extensivamente em vacinas profiláticas, os adjuvantes de alumínio são pouco utilizados para imunizações com fins experimentais de produção de anticorpos policlonais (Stills, 1994).

As emulsões, micropartículas, saponinas, citocinas, componentes ou fragmentos microbianos e lipossomas também foram avaliados como adjuvantes (Apostólico et al., 2016). Tais adjuvantes ativam a imunidade inata e aumentam o recrutamento de células inatas. Os adjuvantes não inflamatórios referem-se a qualquer adjuvante que não induza as citocinas pró-inflamatórias clássicas. As respostas não inflamatórias referem-se a outros efeitos dos adjuvantes, além de sua capacidade de induzir essas citocinas inflamatórias específicas (Wilson; Xiang; Plebanski, 2017). Além disso podemos ativar sistema imune utilizando adjuvantes inflamatórios, como por exemplo adjuvante de Freund (Broderson, 1989).

O Adjuvante de Freund tem uma composição de óleo mineral leve, monooleato de manídeo e fragmentos micobacterianos inativados (Stills, 1991). O adjuvante completo de Freund continua sendo o adjuvante mais amplamente utilizado e mais eficaz para a produção de anticorpos monoclonais, mas seu uso também demonstra diversos efeitos colaterais, incluindo granuloma no local da imunização e em diversos tecidos distantes do local da injeção, dermatite necrosante, entre outros (Stills, 1994, 2004; Broderson, 1989). Os graves efeitos colaterais produzidos pelo adjuvante de Freund impedem o licenciamento deste adjuvante na medicina humana ou veterinária para vacinações profiláticas (Canadian Council on Animal Care, 2002). Para a utilização deste adjuvante no uso para a produção experimental de anticorpos policlonais em animais foi liberado com algumas recomendações de cuidados (Stills, 2007).

Alguns adjuvantes não inflamatórios que foram identificados incluem certos materiais nanoparticulados. Os materiais nanoparticulados exibem propriedades físico-químicas únicas, que podem ser utilizados para a liberação de fármacos e que estão se expandindo a pesquisa para a liberação de vacinas, denominadas nanovacinas (Wilson; Xiang; Plebanski, 2017).

1.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é altamente interdisciplinar e tem uma ampla gama de aplicações em física, engenharia química, elétrica, biofísica, ciência dos materiais, bioquímica e biotecnologia. A principal aplicação da nanotecnologia na ciência biomédica envolve a síntese de novos fármacos, entrega de fármacos, imagem, terapia genética, entre outras (Duran et al., 2006; Kesavan & Venkatraman, 2014). Partículas em escala nanométrica apresentam uma grande área superficial, além de exibirem propriedades ópticas, magnéticas, mecânicas e/ou químicas que são diferentes das partículas macroscópicas (Quina, 2004).

A pesquisa com material nanométrico como a síntese e estabilização do mesmo pode antecipar a fabricação de estrutura da matéria em nível molecular e leva ao início de uma área de atuação, com novas propriedades físico-químicas, ação biológica diversificada e a introdução de uma tecnologia avançada (Nikalje, 2015). A nanotecnologia lida com materiais com tamanhos variando de 0,1 a 100 nm, portanto, devido ao seu pequeno tamanho, é inerente a esses materiais diferentes propriedades como: reatividade química, condutância elétrica, magnetismo, efeitos ópticos e resistência física (Nikalje, 2015).

O estudo desta área do conhecimento é dividido em dois tipos básicos de ferramentas, nanomateriais e nanodispositivos. Estes materiais podem ser subclassificados em nanocristalinos e nanoestruturados. A nanoestrutura consiste em dendrímeros, micelas, conjugados de drogas, nanopartículas metálicas, entre outros, como demonstrado na Figura 2 (Nikalje, 2015).

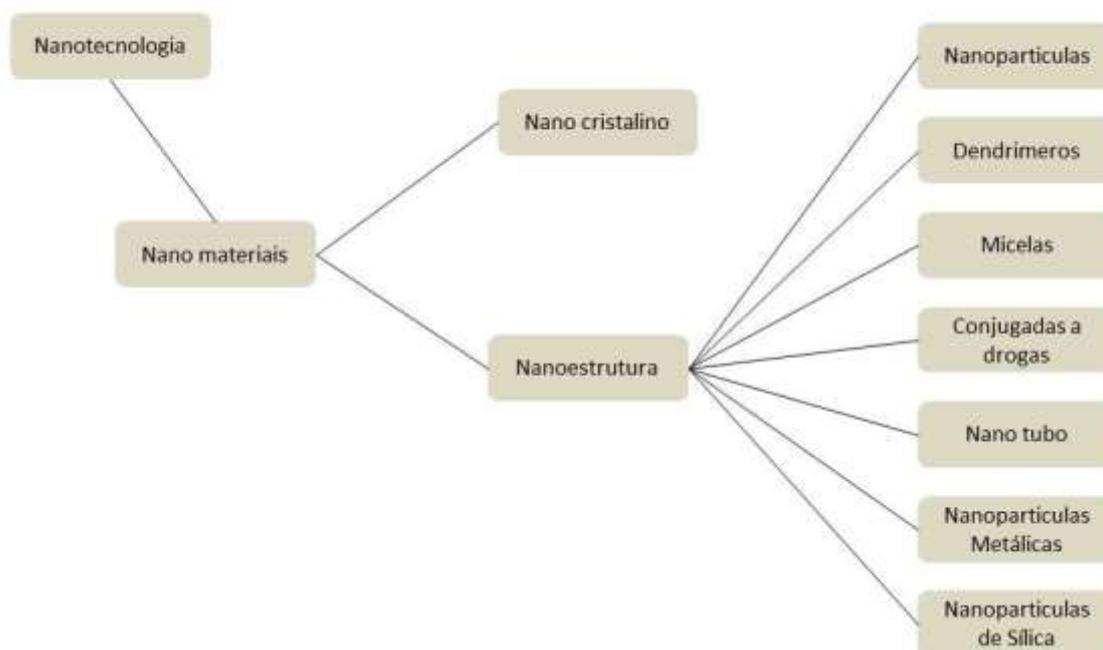


Figura 2 - Fluxograma demonstrativo dos tipos de nanomateriais.

Fonte: Adaptada de Nikalje, 2015.

Durante as últimas décadas, nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, tem despertado muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa (Bhattacharya; Mukherjee, 2008; Nikalje, 2015).

Nanopartículas metálicas têm sido usadas na entrega de drogas, especialmente no tratamento de câncer e em biossensores. Entre os vários metais, as nanopartículas de prata e ouro são de primordial circulação, entrega controlada de material bioativo, entrega dirigida de partículas bioativas aos macrófagos e entrega dirigida ao fígado (Nikalje, 2015). Dentre elas, destacam-se as NPAu, que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalítica (Daniel; Astruc, 2004).

1.4.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As aplicações biomédicas de nanopartículas metálicas começaram na década de 1970 com o uso de nano biconjugados após a descoberta da rotulagem imunológica por Faulk e Taylor (1971). As técnicas tradicionais de imagem

permanecem cruciais no diagnóstico, e as NPAu provam ser superiores aos produtos químicos clássicos. Posteriormente, nanoestruturas foram introduzidas em uma ampla gama de aplicações biológicas (Whitesides, 2003).

Em 1857, Faraday relatou o primeiro artigo científico sobre NPAu, atribuindo a coloração vermelha à natureza coloidal da mesma (Faraday, 1857). As NPAu estão disponíveis na faixa de 1 nm a mais de 100 nm, e sua banda visível de plasmons pode ser observada acima de 3 nm. Estudos divulgam aplicações consideráveis em óptica, catálise, ciência de materiais e nanotecnologia, incluindo também biologia e nanomedicina. Há muitas maneiras de sintetizar NPAu na maioria das vezes a partir de ácido tetracloroáurico (HAu_3Cl_4) comercial (Daniel; Astruc, 2004).

A síntese de NPAu em água foi introduzida por Turkevitch et al., em 1951 (Turkevitch et al., 1951), um método que ainda é usado atualmente para substituir o ligante citrato dessas NPAu por ligantes apropriados de interesse biológico. Modificações recentes do método de Turkevitch permitiram melhor distribuição de tamanho e controle de tamanho dentro da faixa de 9-120 nm (Kimling et al., 2006).

As NPAu são excelentes para a pesquisa na área da saúde, por serem de síntese simples e de fácil caracterização do material. Outra característica marcante das NPAu se dá pelo fato de serem ácido mole é conhecido por se ligar fortemente às bases moles, como os grupamentos tióis (Hainfeld et al., 2006; Mukherjee et al., 2005). As NPAu podem modular o estado redox da célula, alterando o funcionamento normal e alterando vias de sinalização apoptótica de acordo com o tamanho da partícula a ser testada (Gao, 2011). Uma das principais indicações clínicas dos compostos de ouro é para tratamento de doenças reumáticas, por exemplo o uso de aurotiomalato de sódio 100mg/mL intramuscular (Felson et al., 1990; Shaw, 1999; Mota et al., 2013).

Outras aplicações das NPAu são em biossensores, imunoenaios, química clínica, detecção e controle de microorganismos, fototermólise de células cancerígenas, direcionamento de drogas e/ou outras substâncias e monitorização de células e tecidos biológicos (Boisselier; Astruc, 2009; Dreaden et al. 2012).

Em particular, as NPAu servem como carreadores para a entrega de fármacos ou outras substâncias para os tecidos. Já é visto também que o ouro não é bioinerte e que seu efeito pode ser alterado quando modifica seu tamanho e dose (Brown et al., 2008).

Estudo sobre toxicidade do uso de NPAu em animal, demonstrou que NPAu não demonstraram toxicidade em baixas concentrações, quando analisado sobrevivência animal, massa do animal e hematologia, com tempo de 14 dias e 28 dias. Concentrações altas de NPAu induzem redução mínima do peso do animal. Além disso, a via de administração pode influenciar na toxicidade, sendo observado intravenosa menos tóxica em comparação a via oral e intraperitoneal (Zhang et al., 2010).

Alguns estudos já discutem uma possível ação de adjuvante de nanopartículas associados a antígeno para produção de vacinas. A utilização de nanomateriais ligados a fragmentos virais e/ou fragmentos virais sintéticos com efeito de entrega e ativação do sistema imune (Dykman et al, 2004; Guevel et al, 2012; Smith et al., 2013). Dykman et al (2004), utilizou NPAu associados a antígenos em diferentes animais de laboratório, e observou aumento no título de anticorpos produzidos nestes animais. Neste mesmo trabalho, também foi verificado o aumento da resposta imunitária, aumento da atividade das proteínas do sistema complemento, bem como atividade fagocítica e bactericida. Guevel et al (2012), observou que a administração de NPAu 12nm, induziu resposta imune acompanhando por estimulação de células natural killer, enquanto nanopartículas de 2nm não induzem proliferação de células imunes. Em resumo este efeito pode ser discutido como pela funcionalização e tamanho das nanopartículas.

Estudos utilizando diferentes morfologias de NPAu demonstrou que a interação entre nanopartícula e proteína e a resposta imune foi melhor em nanoesferas de ouro com tamanho de 40nm em comparação com nanobastões, nanocubos e nanoesferas de 20nm (Niikura et al., 2013). Dykman et al., (2018) demonstrou que NPAu estão sendo combinado com diferentes imunoestimulantes, e que tais moléculas influenciam diretamente na ativação e na titulação de anticorpos. Zhang et al., (2019), observaram que NPAu com tamanho maior, de 50 e 100 nm, podem alcançar maior entrega de antígeno, aumentando a resposta imune humoral, formação de células B e maiores níveis de anticorpos, quando comparados com nanopartículas entre 5 e 50 nm.

1.4.2 LIPOSSOMAS

Os lipossomas são amplamente utilizados como carreadores para otimizar eficácia terapêutica, devido seus efeitos de direcionamento de entrega, proteção,

biocompatibilidade e características ajustáveis (Wang; Chen; Wang, 2019). Os lipossomas são vesículas esféricas constituída com dupla camada de fosfolipídios e núcleo aquoso. Estas vesículas são classificadas por seu tamanho, número de camadas fosfolipídicas e sua carga (Vemuri; Rhodes, 1995). Além disso pode-se ocorrer o encapsulamento de compostos tanto hidrofílico, por ter núcleo aquoso, e compostos hidrofóbicos, devido sua bicamada lipídica. Este fator é importante por proteger o composto de decomposição e entregar no alvo específico (Shehata et al., 2008; Akbarzadeh et al., 2013).

A utilização de lipossomas junto a antígenos para vacina contra doenças que ameaçam da vida. Esta aplicação serve como sistema de liberação de antígenos, com intuito de otimizar seus efeitos sobre o sistema imunológico (Wang; Chen; Wang, 2019). Tais relatos do uso de lipossomas como adjuvantes, já foram observados por Gregoriadis e Allison (1974), quando demonstrou que imunização em camundongos com toxóide da difteria utilizando lipossomas, a base de fosfolipídios, como adjuvante, aumentando a titulação de anticorpos em comparação com os imunizados somente com toxóide. Desde então a pesquisa sobre lipossoma como adjuvante vem aumentando, sendo que sua eficácia pode ser avaliada de acordo com seu tamanho, carga, números de camadas, entre outros fatores (Tandrup Schmidt et al., 2016).

Os lipossomas adequam-se a várias vias de imunização, principalmente quatro formas de administração: injetável (como injeção intramuscular, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal e intravenosa), administração tópica; absorção oral e inalação. Normalmente, a vacinação é realizada através da administração em três locais: músculo, mucosa e pele; no entanto, recentemente, a injeção intravenosa, imitando o processo natural de transmissão (Wang; Chen; Wang, 2019).

Os lipossomas são capazes de interagir com células apresentadoras de antígenos e aumentar à exposição do antígeno a mesma, o que resulta em uma resposta imune aumentada e sua morfologia pode influenciar o tipo de resposta imunológica (Brunner; Jensen-Jarolim; Pali-Schöl, 2010; Oyewumi, Kumar, Cui, 2010).

O presente estudo avaliou novos adjuvantes a base de materiais nanoparticulado. Para isto verificamos o efeito das NPAu e lipossomas como adjuvante para aplicação em imunização, já visto que vem sendo descrito que tais nanomaterias já possuem atividade imunomodulatória ativando a resposta imune

Th2, que está envolvida na ativação de linfócitos-B e na produção de anticorpos. Além disso vamos verificar se a utilização de tais adjuvantes pode levar a quadro de dano oxidativo celular em tecidos ligados diretamente a metabolização e excreção de fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito adjuvante de dois nanomateriais na imunização de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a associação dos nanomateriais com proteína LiHyA, para imunização;
- Imunizar os animais com proteína associados a lipossomas e proteína associados a NPAu
- Avaliar a titulação de anticorpos produzidos contra proteína associado à nanomateriais.
- Avaliar efeitos de estresse oxidativo nos tecidos fígado, rim e baço após imunização.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O seguinte projeto foi executado dentro das normas éticas estabelecidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) experimentação animal. O início dos procedimentos experimentais envolvendo animais só foi realizado após a aprovação do comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), no protocolo 73/2020. No final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por meio químico seguindo os protocolos éticos e científicos.

3.2 TÉCNICAS LABORATORIAIS

3.2.1 Síntese das nanopartículas de ouro (NPAu)

NPAu com tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, SP, Brasil). Inicialmente, 100 mL de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 95 °C e sob agitação. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando durante 20 minutos. A solução adquiriu a coloração correspondente ao tamanho.

3.2.2 Síntese de Lipossomas

Os lipossomas foram preparados usando um método de evaporação em fase reversa (Micheletto et al., 2015; dos Santos et al., 2018; Kroetz et al., 2019). Resumidamente, fosfatidilcolina e $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{GlcNAc}$ purificados foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio e adicionados 0,3 mL de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,2). Em seguida, a mistura foi sonicada por 2 a 3 minutos em um sonicador de banho, produzindo uma dispersão homogênea e opalescente de micelas reversas. O clorofórmio foi evaporado em um evaporador

rotatório sob vácuo, resultando em um organo-gel viscoso. As películas lipídicas secas foram dessecadas a vácuo por 2 h e ressuspensas em tampão fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,2), e depois adicionadas ao organo-gel com agitação vigorosa para produzir amostras de lipossomas.

3.2.3 Caracterização das NPAu e Lipossomas

3.2.3.1 Espectroscopia de Ultravioleta-visível

A solução de NPAu foi caracterizada empregando-se as técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800. Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP, foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

3.2.3.2 Espalhamento de luz eletroforético (ELS)

A determinação do potencial zeta foi realizada com o uso do equipamento NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corporation NY, EUA), com controle de temperatura e laser padrão vermelho 640 nm de 40 mW, foram realizadas medições da mobilidade eletroforética (UE) e convertidas em valor em potencial (mV) pelo próprio software do equipamento, as medidas ocorreram em vinte ciclos com intervalo de 1 segundo para cada ciclo. A análise de potencial zeta baseia-se na medição da repulsão entre as partículas dispersas em meio líquido. As medidas foram realizadas nas amostras dissolvidas em água deionizada, para as amostras sintetizadas. As leituras foram realizadas a 25°C. As análises foram realizadas no Laboratório de Processamento de Polímeros Avançados (LAPPA), no iParque/UNESC.

3.3 ASSOCIAÇÃO DA LiHyA COM NANOMATERIAIS

3.3.1 Conjugações a NPAu e lipossoma

A conjugação das nanopartículas e lipossomas foi realizada adicionando a proteína LiHyA na solução de nanomaterial. Após, a mistura em agitação por 5min em temperatura ambiente, o material foi imunizado nos animais. A concentração da

proteína (25µg/mL) foi decidida a partir de estudos anteriores, que demonstraram a produção de anticorpo.

3.3.2 Caracterização da associação do nanomaterial com a proteína

A distribuição do tamanho e o potencial zeta dos lipossomas e NPAu serão medidos na temperatura ambiente, usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de luz eletroforético (Rezaei et al.,2019).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

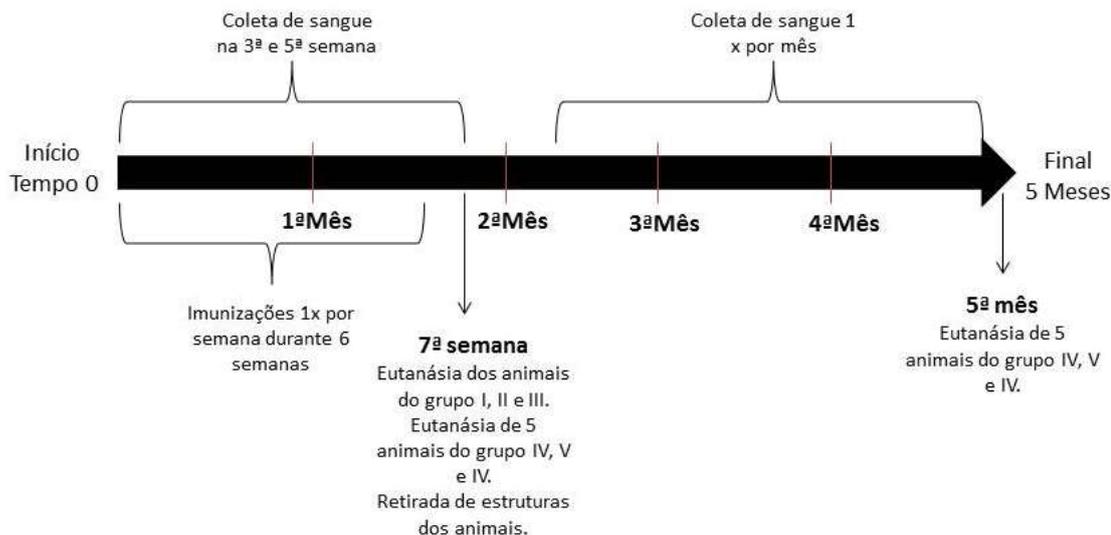
Para o seguinte projeto serão utilizados 45 camundongos swiss (2 meses pesando entre 25 - 30 g). Cada grupo teve um “n” amostral de cinco animais, necessários para a realização das análises imunológicas. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas, temperatura ambiente controlada entre 20 ± 22°C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos randomicamente em 3 grupos experimentais (n: 5) e 3 grupos experimentais com n: 10 animais:

- I. Grupo Controle – Animais sem imunização (n=5);
- II. Grupo NPAu (NPAu) – Animais imunizados com solução de 0,318mg/Kg de NPAu (n=5);
- III. Grupo Lipossoma – Animais imunizados com solução de 27mg/Kg de lipossoma (n=5);
- IV. Grupo NPAu + LiHyA - Animais imunizados com solução de 0,318mg/Kg de GNP e 0,113mg/Kg de LiHyA (n=10);
- V. Grupo lipossoma + LiHyA - Animais imunizados com solução de 27mg/Kg de lipossoma e 0,113mg/Kg LiHyA (n=10);
- VI. Grupo AIOH + LiHyA - Animais imunizados com solução de 4,54mg/Kg de hidróxido de alumínio e 0,113mg/Kg LiHyA (n=10).

3.5 IMUNIZAÇÃO

A administração dos nanomateriais associados a proteína foi realizada por via subcutânea. O tratamento ocorreu através de uma imunização por semana com duração de 6 semanas.



Uma amostra de sangue foi coletada antes da primeira imunização, para obtenção do soro que serviu como controle (soro pré-imune). A coleta de sangue também foi realizada antes das imunizações na 3ª semana, 5ª semana e 7ª semana, para obtenção do soro imune, utilizado para dosar a produção de anticorpos. Para os grupos VII, VIII e IX, também foi coletado 1 vez por mês após 7ª semana com duração de 5 meses. Os soros foram armazenados em freezer -20°C para posteriores análises. Após os experimentos, os animais foram submetidos a eutanásia por método químico utilizando tiopental e os órgãos fígado, rim e baço foram retirados e congelados no freezer a -80°C , para posteriores análises.

3.6 TÉCNICA DE ELISA

Foi realizado curva de titulação prévia para determinar as concentrações de antígenos e a diluição dos anticorpos a serem utilizados. Placas flexíveis de imunoensaio de microtítulos Falcon (Becton Dickinson) foram revestidas com o proteína LiHyA ($1 \mu\text{g}/\text{poço}$) em $100 \mu\text{L}$ de tampão de cobertura pH 9.6 por 18 h a

4°C. Após a sensibilização, foi realizado bloqueio utilizando 200 µL de solução contendo PBS, Tween 20 0,05% (PBS-T) e 5% de solução de caseína por 1 h a 37°C. Em seguida as placas serão lavadas por 5 vezes utilizando PBS-T, e feita incubação com 100 µL de soro camundongo por 1 h a 37°C. As amostras de soro serão diluídas 1:200 em PBS-T contendo 0,5% de solução de caseína. As placas foram lavadas 7 vezes utilizando PBS-T, e posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1:10000 por 1 h a 37°C. Novamente as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T, feita incubação com H₂O₂, orto-phenylenediamine e tampão citrate-fosfato pH 5.0 por 30 min no escuro. A reação foi parada adicionando 25µL H₂SO₄ (1mol/L) e a densidade óptica lida em espectrofotômetro para microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) a 492 nm.

3.10 DETERMINAÇÃO INTRACELULAR DE ERO

Diclorofluoresceína (DCFH): A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de DCFH a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO de acordo com o método descrito por Dong (2010), com algumas modificações.

3.11 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

Conteúdo de Proteínas Oxidadas: Foi determinado a partir do conteúdo total de tióis na presença de DTNB e lido espectrofotometricamente a 412nm (Aksenov e Markesbery, 2001).

Carbonilação de Proteínas: A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al. (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹. cm⁻¹.

3.12 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Superóxido Dismutase (SOD): Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister; Calabrese (1987). As amostras do fígado, rim e baço foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15 μ L foram retiradas da mesma, a qual 5 mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185 mL (0,75 g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 μ L adrenalina (60 mM em água destilada + 15 mL/mL de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (u/mg de proteína).

3.13 CONTEÚDOS DE PROTEÍNAS

O teor de proteína a partir de tecido muscular homogeneizado foi determinado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) ser adicionado para ligar-se à proteína. O reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul. Absorbância foi lida a 750nm.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e erro padrão médio, analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido pelo teste Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $P < 0,05$. Para tratamento estatístico do projeto de tese, será utilizado o software graphpad 5.0.

4 RESULTADOS

A realização do projeto seguiu em uma sequência experimental planejada, sendo primeiramente a síntese dos compostos nanoparticulados, imunizações dos animais com os nanomateriais e por fim as dosagens bioquímicas.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

A NPAu e o lipossoma foram caracterizados por análise do potencial zeta e espalhamento de luz eletroforética. A solução de NPAu demonstrou um tamanho de partícula de 27,08 nm, com carga superficial de -16,66 mV. A associação da NPAu com a proteína LiHyA (NPAu + LiHyA), com concentração final de 25 mg/mL de LiHyA, obteve tamanho médio de 198,19 nm e carga superficial de -7,07mV. Assim, após a associação, observou-se um aumento no tamanho e alteração na carga superficial.

Tabela 1 – Resultados das análise do potencial zeta e espalhamento de luz eletroforética, nos compostos utilizados neste projeto.

Grupos	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro (nm)
Proteína LiHyA	-12,81	89,67
NPAu	-16,66	27,08
NPAu + LiHyA	-7,07	198,19
Lipossoma	-26,58	253,42
Lipossoma + LiHyA	-16,44	295,23

O lipossoma apresentou resultados de 253,42 nm de tamanho e uma carga superficial de -26,58mV, sendo que após a associação com a proteína LiHyA na concentração de 25mg/mL observou-se um aumento no tamanho para 295,23 nm e com alteração da carga superficial para -16,44 mV.

4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

A produção de anticorpos policlonais foram iniciadas através da administração dos nanomateriais associados ou não a nanopartículas por via subcutânea. O resultado para imunizações utilizando as NPAu como adjuvante estão apresentados na figura 2 e figura 3, sendo que o grupo NPAu não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle em nenhum dos tempos testados. Os grupos NPAu + LiHyA e AlOH₃ + LiHyA foram diferentes do grupo controle e NPAu, nos tempos 3, 5 e 7 semanas, que são correspondentes a 2, 4 e 6 imunizações respectivamente. No período de 3 e 5 semanas apresentaram os seguintes resultados, o grupo AlOH₃ + LiHyA obteve um aumento na produção de

anticorpo em relação ao grupo NPAu + LiHyA e no período de 7 semanas de imunização não teve diferença entre NPAu + LiHyA e AIOH₃ + LiHyA.

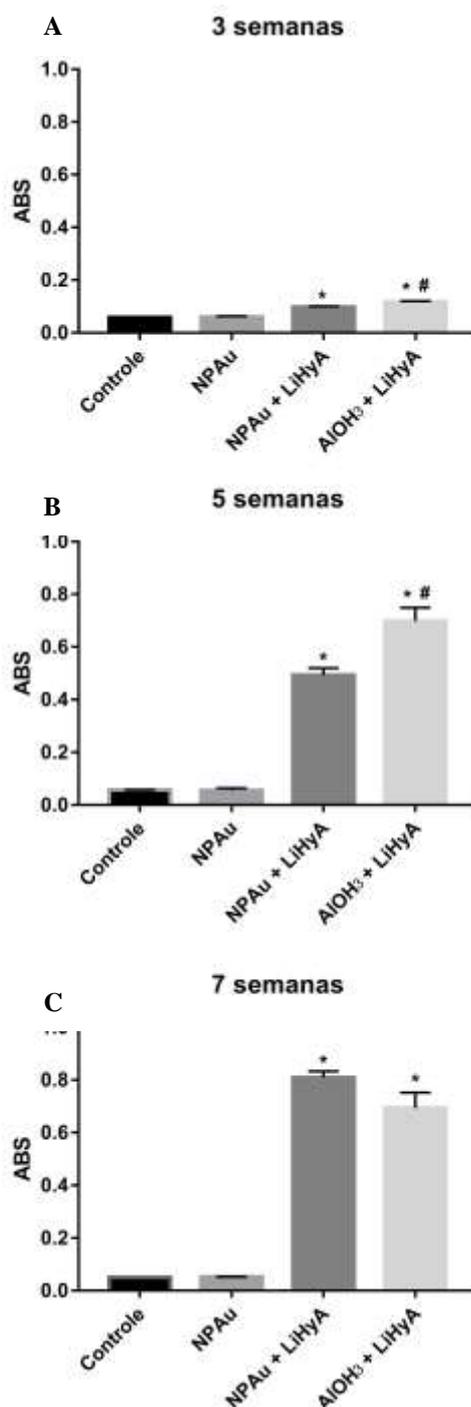


Figura 3 - Efeito da administração de NPAu associados a proteína LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss. (A) após 2 imunizações; (B) após 4 imunizações; (C) após 6 imunizações. Os dados são apresentados em Média ± EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com os grupos controle e NPAu ($p > 0,05$).

Diferença estatística quando comparado com AIOH₃ contra NPAu + LiHyA ($p > 0,05$).

Seguindo o efeito crônico das imunizações utilizando NPau como adjuvante, as análises de anticorpos produzidos contra o antígeno LiHyA durante o período de 2, 3, 4 e 5 meses após primeira imunização demonstrou que à uma queda desta titulação. No 2º mês há uma única diferença estatística é do grupo NPau + LiHyA com aumento do nível de anticorpo com relação aos grupos NPau e grupo controle. O 3º mês a diferença estatística é dos grupos NPau + LiHyA e AIOH₃ + LiHyA com relação aos grupos GNP e controle. Para 4º e 5º mês o grupo NPau + LiHyA demonstrou diferença estatística, com aumento nos níveis de anticorpos, com relação aos grupos AIOH₃ + LiHyA, NPau e controle.

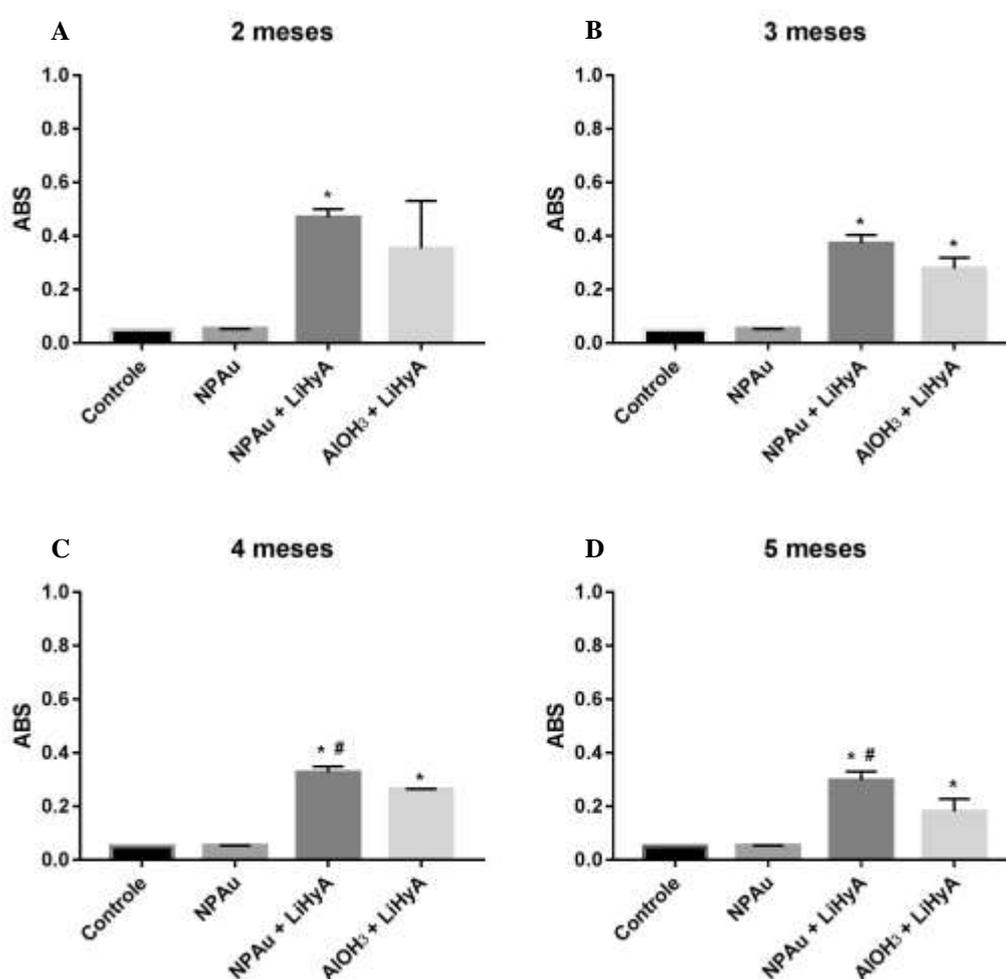


Figura 4 - Efeito a longo prazo após a administração de NPau associados a proteína LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss. (A) 2 meses após a primeira imunização; (B) 3 meses após a primeira imunização; (C) 4 meses após a primeira imunização; (D) 5 meses após a primeira imunização. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo: * Diferença estatística quando comparado com todos os grupos testados ($p > 0,05$). # Diferença estatística quando comparado com NPau + LiHyA contra AIOH₃ ($p > 0,05$).

O resultado das imunizações com lipossomas foi similar as descritas com NP Au, conforme demonstrado na figura 4. O grupo lipossoma não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle em todos os tempos testados. O grupo AlOH_3 + LiHyA teve um aumento no título de anticorpos quando comparado com lipossoma na 3 semana de imunização. Durante o período de 5 e 7 semanas a diferença estatística, sendo aumento de anticorpos, foi entre os grupos lipossoma + LiHyA e AlOH_3 + LiHyA quando comparado entre os grupos lipossoma e controle.

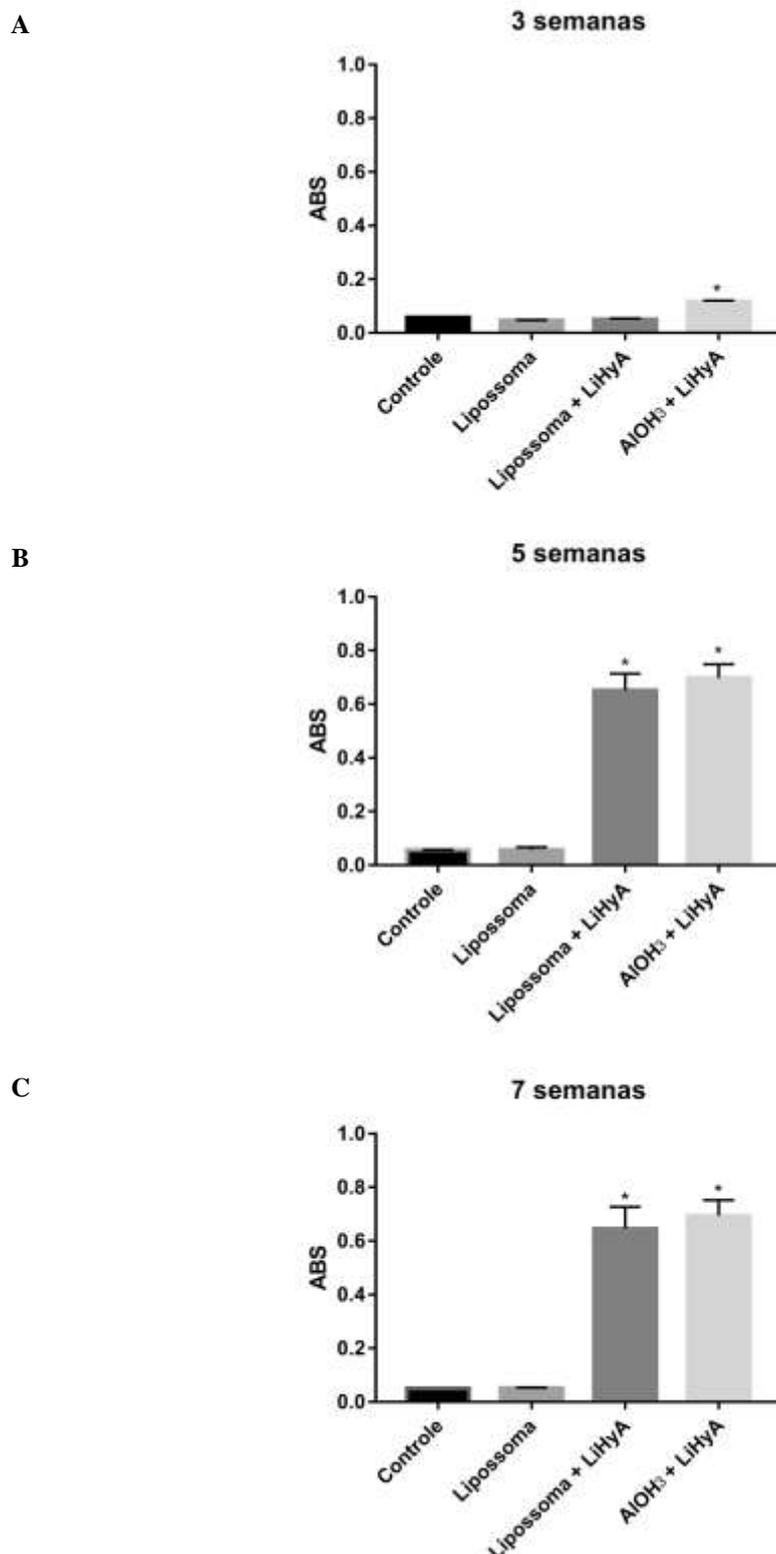


Figura 5 - Efeito da administração de lipossoma associados a LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss. (A) após 2 imunizações; (B) após 4 imunizações; (C) após 6 imunizações. Os dados são apresentados em Média ± EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com os grupos controle e lipossoma ($p > 0,05$).

Para os demais tempos seguindo para efeito a longo prazo das imunizações utilizando os lipossomas como adjuvantes, nos tempos de 2 e 3 meses obtivemos diferença estatística do grupo lipossoma + LiHyA com relação aos grupos controle e lipossoma. Já nos tempos 4 e 5 meses podemos observar a diferença estatística, com aumento dos anticorpos, do grupo lipossoma + LiHyA com relação aos grupos AlOH_3 + LiHyA, controle e lipossoma. Na figura 5 podemos também observar que AlOH_3 + LiHyA teve um aumento dos anticorpos com relação aos grupos controle e lipossoma em todos os tempos.

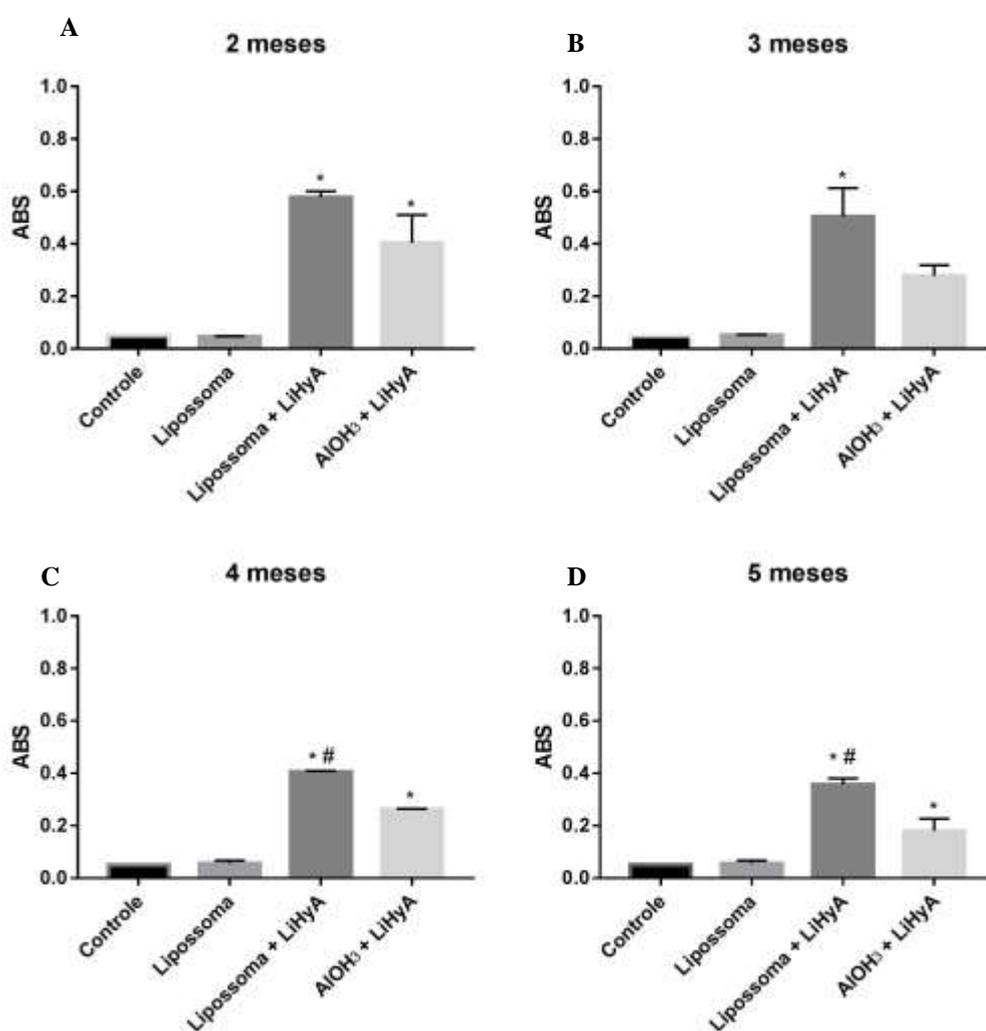


Figura 6 - Efeito a longo prazo após a administração de lipossoma associados a LiHyA no nível de produção de anticorpos IgG em soro de camundongos Swiss. (A) 2 meses após a primeira imunização; (B) 3 meses após a primeira imunização; (C) 4 meses após a primeira imunização; (D) 5 meses após a primeira imunização. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:
 * Diferença estatística quando comparado com todos os grupos testados ($p > 0,05$).
 # Diferença estatística quando comparado com NPAu + LiHyA contra AlOH_3 + LiHyA ($p > 0,05$).

4.3 DANO TECIDUAL

Os danos oxidativos nas estruturas celulares causados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio foram avaliados por carbonilação de proteínas e conteúdo de sulfidril. Como podemos observar na figura 6A, não demonstrou diferença significativa entre os grupos na estrutura do baço, mas observamos diferença estatística na análise de carbonilação (figura 6B) no grupo $AlOH_3 + LiHyA$ em relação a todos os grupos, para estrutura do baço. Para análises da estrutura do fígado, na figura 6C e 6D, observamos que não demonstrou diferença estatística entre os grupos nas análises de conteúdo de sulfidril e carbonilação de proteínas. O mesmo ocorreu para a análise no rim (figura 6E e 6F) dos parâmetros anteriormente citados, não observamos diferença estatística em relação aos grupos para os dois parâmetros de análises. Tais análises foram referentes aos grupos a curto prazo, sendo 7 semanas de experimento.

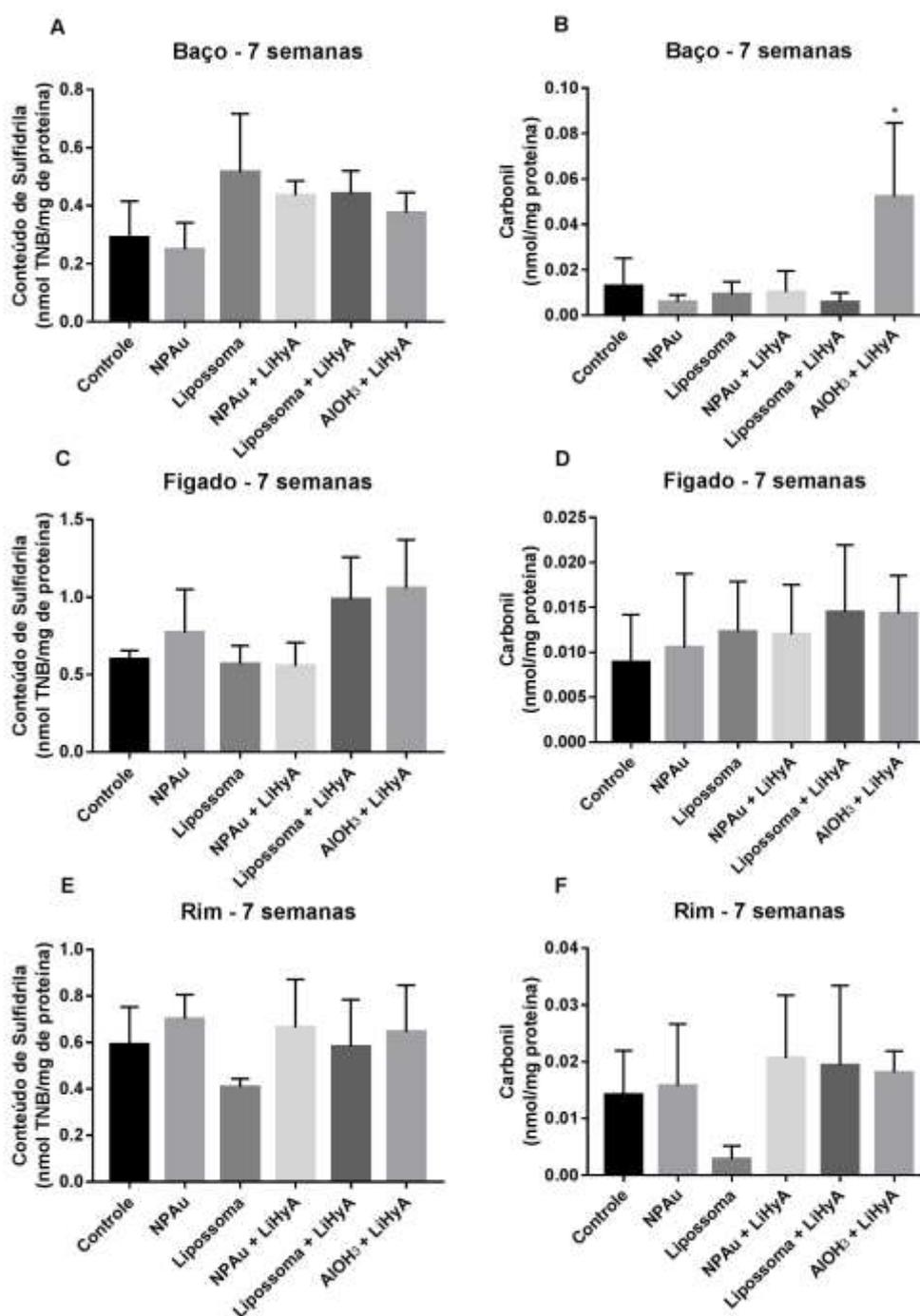


Figura 7 – Avaliação do dano oxidativo causado por 6 imunizações com diferentes adjuvantes por via subcutânea em camundongos swiss em diferentes tecidos. (A) Níveis do conteúdo de sulfidril no baço; (B) níveis de carbonilação proteica no baço; (C) níveis do conteúdo de sulfidril no fígado; (D) níveis de carbonilação proteica no fígado; (E) níveis do conteúdo de sulfidril no rim; (F) níveis de carbonilação proteica no rim. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com todos os grupos testados ($p > 0,05$).

Quando verificamos o efeito em longo prazo da administração de diferentes adjuvantes para parâmetros de conteúdo de sulfidrina e carbonilação de proteínas, podemos observar que, na estrutura do baço (figura 7A e 7B), demonstrou diferença estatísticas do grupo NPAu + LiHyA em relação aos demais grupos, em todos os dois parâmetros testados, com aumento dos níveis tanto para sulfidrina e carbonilação proteica. No grupo lipossoma + LiHyA, no parâmetro de sulfidrina, observamos que teve diferença significativa com relação aos grupos controle, NPAu e lipossoma, sendo que teve um aumento dos seus níveis (figura 7A). Na figura 7C e 7D o qual se trata da estrutura do fígado, não observamos diferença estatística entre os grupos nos parâmetros testados, mas na estrutura do rim (figura 7E e 7F), observamos uma redução da carbonilação no grupo lipossoma em relação aos demais grupos.

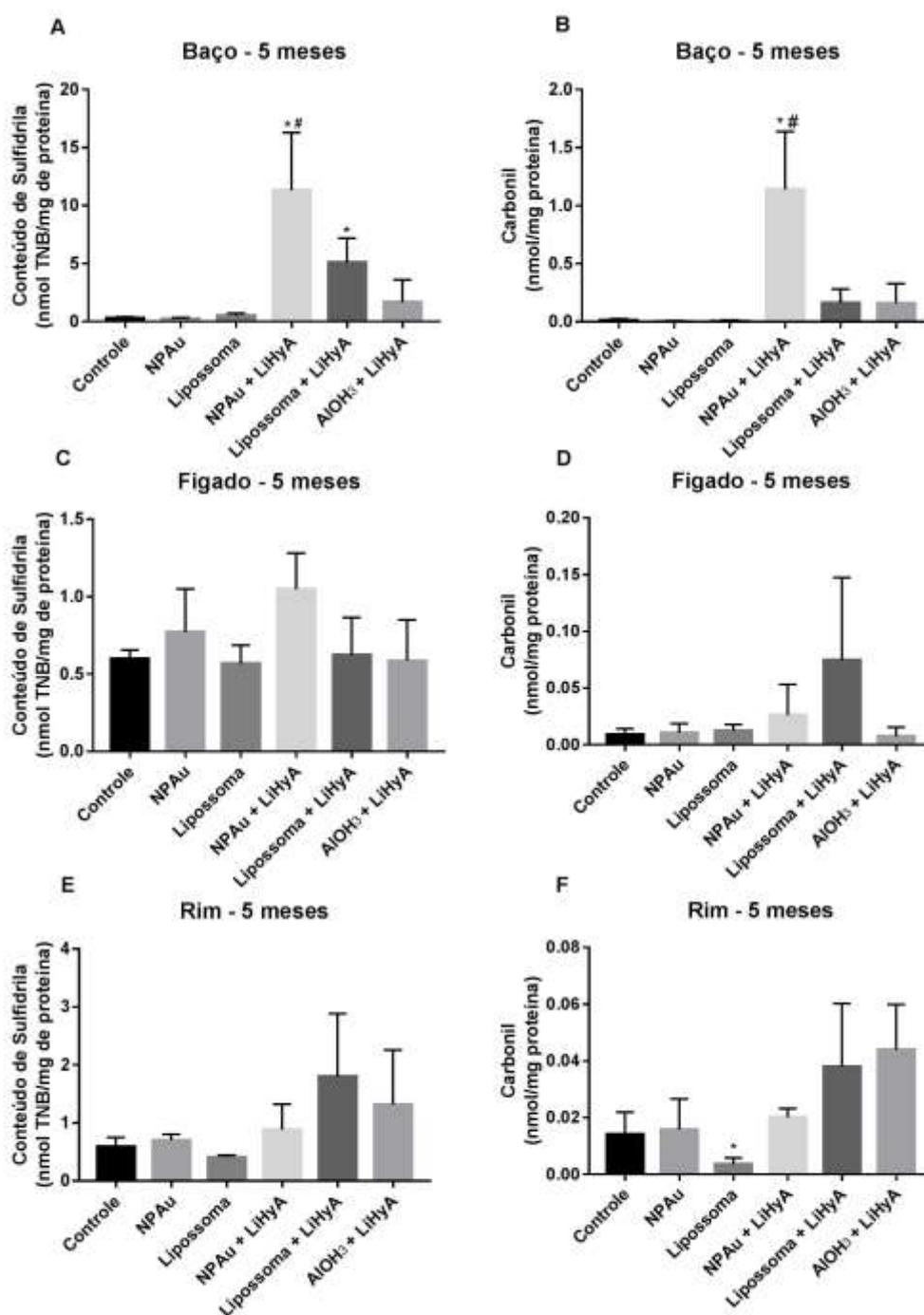


Figura 8 - Avaliação do dano oxidativo causado por 6 imunizações com diferentes adjuvantes por via subcutânea em camundongos swiss em diferentes tecidos, sendo 2, 3, 4 e 5 meses após a primeira imunização. (A) Níveis do conteúdo de sulfidril no baço; (B) níveis de carbonilação proteica no baço; (C) níveis do conteúdo de sulfidril no fígado; (D) níveis de carbonilação proteica no fígado; (E) níveis do conteúdo de sulfidril no rim; (F) níveis de carbonilação proteica no rim. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com os grupos controle, NPAu e lipossoma ($p > 0,05$).

Diferença estatística quando comparado com os grupos lipossoma + LiHyA e AlOH₃ + LiHyA ($> 0,05$).

4.4 ESPECIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Quando analisamos os níveis de DCFH nos tecidos após 7 semanas de exposição as adjuvantes, observamos que no baço ocorreu uma diminuição dos níveis nos grupos NPAu + LiHyA e lipossoma + LiHyA em relação ao grupo controle. No rim observamos um aumento dos níveis de DCFH no grupo $AlOH_3$ + LiHyA em relação aos grupos NPAu + LiHyA e lipossoma + LiHyA. No fígado não observamos diferença estatística entre os grupos com relação aos níveis de DCFH.

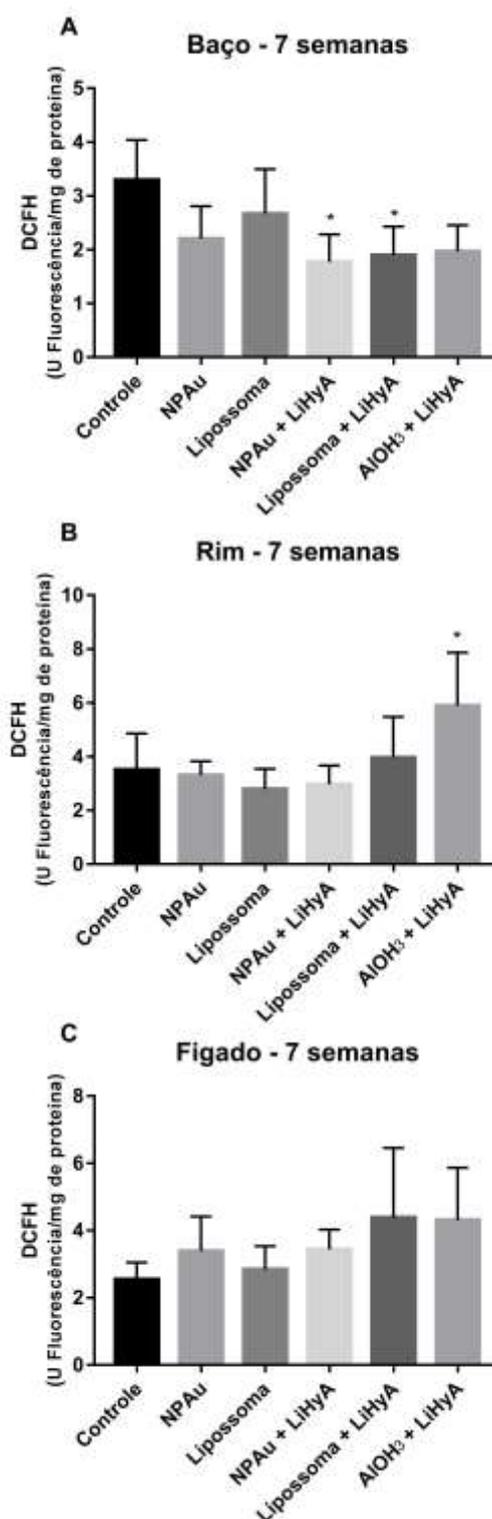


Figura 9 – Avaliação dos níveis de oxidantes, através da técnica de DCFH, após a administração dos nanomateriais associados a LiHyA diferentes tecidos de camundongos swiss. (A) Níveis de DCFH no baço; (B) níveis de DCFH no rim e (C) níveis de DCFH no fígado. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com grupo controle ($p > 0,05$).

** Diferença estatística quando comparado com NP Au + LiHyA e lipossoma + LiHyA ($p > 0,05$).

Quando verificamos o efeito crônico dos imunização em período de 5 meses, observamos que no tecido baço o grupo lipossoma + LiHyA demonstrou um aumento dos níveis de DCFH com relação aos demais grupos. No fígado e no rim não observamos diferença significativa entre os grupos.

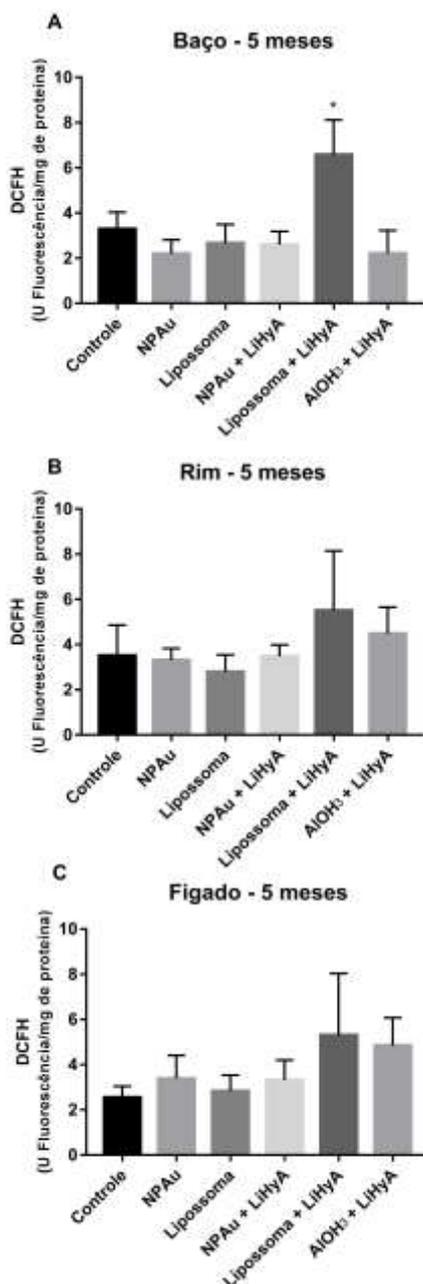


Figura 10 – Efeito a longo prazo após a última administração dos nanomateriais associados a LiHy no nível do sistema oxidante em camundongos swiss. (A) Níveis de DCFH no baço; (B) níveis de DCFH no rim e (C) níveis de DCFH no fígado. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com todos os grupos testados ($p > 0,05$).

4.5 DEFESA ANTIOXIDANTE

A análise da atividade da SOD, após 7 semanas, podemos observar um aumento da sua atividade no tecido do rim (figura 10B), sendo os grupos NP Au + LiHyA e lipossoma + LiHyA diferentes dos demais grupos. No tecido do fígado (figura 10C) também observamos estes achados, com algumas diferenças, neste tecido o grupo NP Au não teve diferença com grupo AlOH_3 + LiHyA.

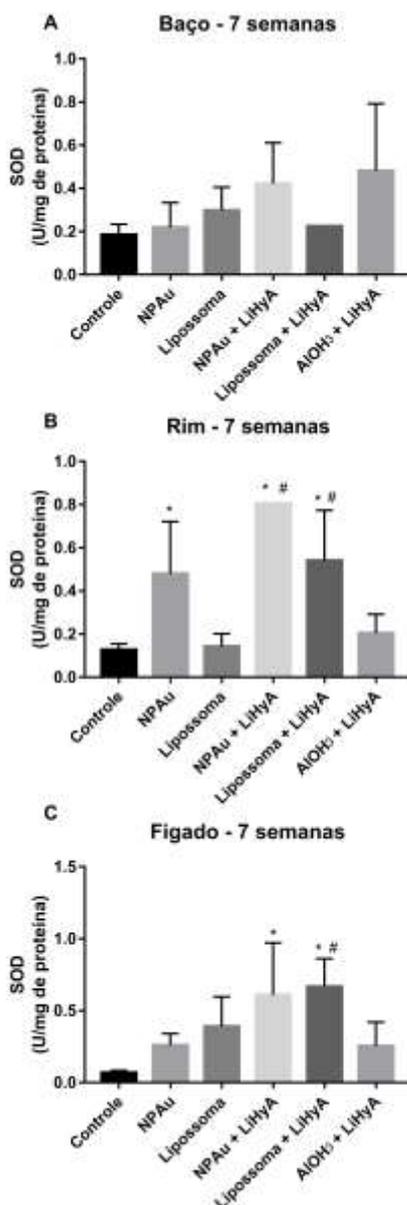


Figura 11 – Avaliação da atividade da enzima SOD após a administração dos nanomateriais associados a LiHyA, nos diferentes tecidos em camundongos swiss. (A) Níveis de SOD no baço; (B) níveis de SOD no rim e (C) níveis de SOD no fígado. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com grupo controle, NP Au e lipossoma ($p > 0,05$).

Diferença estatística quando comparado com AlOH_3 + LiHyA ($p > 0,05$).

Quando avaliamos a atividade da SOD, a longo prazo (5 meses) as imunizações verificamos uma diferença na sua atividade após 5 meses da imunização. No tecido do baço observamos que o grupo NPAu + LiHyA aumentou a atividade da SOD em relação aos demais grupos. A atividade também aumentou no grupo NPAu no rim, quando comparamos com demais grupos. Conforme demonstrado na figura 11C, os níveis da atividade da SOD aumentaram no grupo lipossoma no tecido do fígado, quando comparados com os grupos controle e com grupo NPAu + LiHyA.

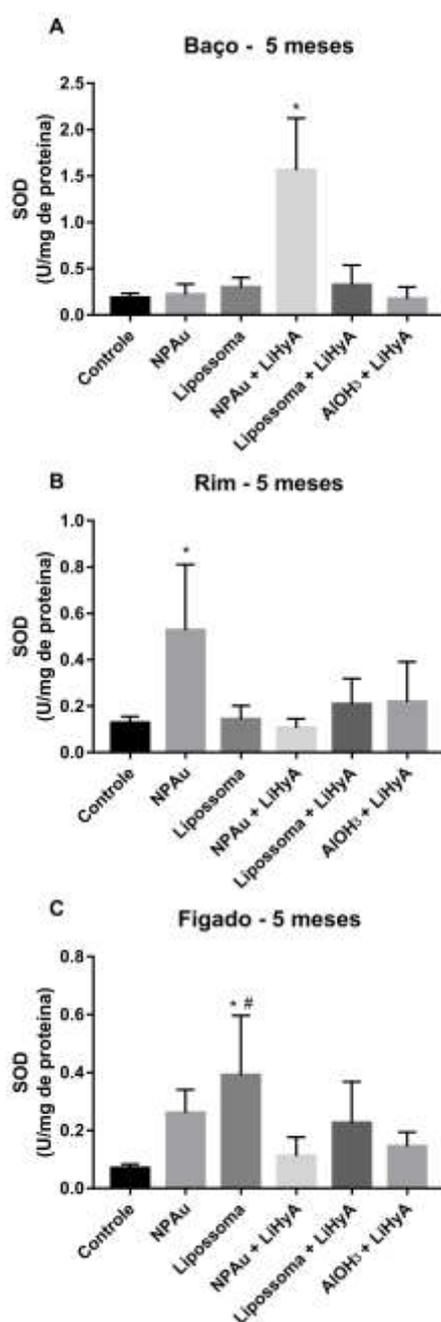


Figura 122 - Efeito a longo prazo após a última administração dos nanomateriais associados a LiHyA no nível do sistema antioxidante em camundongos swiss. (A) Níveis de SOD no baço; (B) níveis de SOD no rim e (C) níveis de SOD no fígado. Os dados são apresentados em Média \pm EPM pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste tukey, sendo:

* Diferença estatística quando comparado com os grupos testados ($p > 0,05$).

Diferença estatística quando comparado com NPAu + LiHyA ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o aumento no número de proteínas como bases para novos potenciais terapêuticos tem emergido consideravelmente. Apesar de tais moléculas estarem revolucionando o cenário farmacêutico, os efeitos farmacocinéticos adversos têm muitas vezes representado certa dificuldade para desenvolvimento de novas terapias (Shen et al., 2017). Dentre os efeitos, a utilização de adjuvantes a base de alumínio é uma alternativa para melhor ativação do sistema imune, mas ainda sim apresenta alguns inconvenientes. O estudo sobre a utilização de nanocarreadores, já vem sendo demonstrada uma possível solução alternativa ao uso de adjuvantes convencionais, devido a seus aspectos físico-químicos, além de sua atividade nanocarreadora.

O presente estudo avaliou o efeito da utilização de lipossoma e NPAu associado a proteína LiHyA, sobre a produção de anticorpos a curto e longo prazo. Primeiramente, nossos resultados demonstraram que quando LiHyA foi associado com NPAu, esta nova molécula aumentou de tamanho, que pode corresponder a uma interação entre o nanomaterial e a proteína. Estudos já identificaram que NPAu interagem com grupamentos tióis e aminas, sendo tal interação responsável por aumentar o tamanho da partícula e de certo modo proporcionar efeito carreador do nanomaterial. (Dreaden et al.2012)

Quando verificamos o lipossoma podemos observar que as alterações de tamanho são pequenas no qual pode ser atribuído pelo tamanho natural do lipossoma. Ainda assim conseguimos identificar alteração no potencial sugerindo tal interação da molécula de proteína com lipossoma.

Sabendo que proteína é cadeia de aminoácidos interligados, sugerimos que tal composto de nanopartícula pode ter facilidade a se ligar a proteína já ela que possui diversos grupos funcionais, incluindo os tióis e as aminas. Outro ponto chave que devemos levar em consideração é que após interação na superfície do nanomaterial, tal nanopartícula pode aumentar o seu tamanho, sendo este mais facilmente reconhecido pelo sistema imune. As alterações de tamanho da associação entre o nanomaterial com a proteína seria algo benéfico para nosso estudo, já que o aumento da partícula pode auxiliar o sistema imune na identificação da proteína associada, além do efeito isolado do nanomaterial sobre sistema imune,

como imunoestimulador, agindo na sinalização das interleucinas e quimiocinas (Dykman et al., 2004).

Conseqüentemente, a utilização de nanomateriais como sistema de entregas e/ou adjuvantes oferece uma ótima oportunidade para um aumento na ativação do sistema imune, referente a resposta inata, além disso pode ser capaz de induzir significativamente a resposta imune adaptativa com mínimo de toxicidade (Shen et al., 2017).

Ao longo de décadas de processo de pesquisa lento, nos últimos anos ocorreu uma crescente aceleração no desenvolvimento de vacinas com a utilização de adjuvantes que foram aprovadas para uso em humanos. Tais adjuvantes são compostos de diferentes componentes em sua formulação, mas compartilham de algumas características-chave, como por exemplo, induz a ativação da imunidade inata e adaptativa, que então se traduz em respostas celulares e produção de anticorpos com passar do tempo.

O atual estudo observou a elevação dos níveis de anticorpos contra um determinado antígeno quando utilizado nanomateriais como adjuvante. Inicialmente foi realizado a dosagem de anticorpos com a proteína LiHyA antes da 3^o e 5^o semanas de imunização. As imunizações ocorreram semanalmente e com 2 e 4 imunizações já conseguimos observar um aumento de anticorpos do grupo que foi imunizado com adjuvante Al(OH)₃. Tal resposta já era esperada, já que tal adjuvante é amplamente utilizado na prática clínica.

Estudo de Shi et al., 2001, utilizando adjuvante a base de alumínio, demonstrou que alteração do pH levou a um aumento na capacidade de adsorção, que promoveu o armazenamento do antígeno e interação com as células apresentadoras de antígeno, resultando em uma resposta imune mais forte. Tal adsorção do antígeno no alumínio desencadeia a interação com as células apresentadoras que ativam a resposta imune. Este processo é relatado como efeito causado principalmente pela alteração das características físicas dos adjuvantes a base de alumínio, tais alterações como carga elétrica, área da superfície, estrutura, entre outras (Shi et al., 2001).

As interações dos adjuvantes a base de alumínio já estão bem descritas, Rimaniol et al., 2004 investigou tais interações e observaram que macrófagos com hidróxido de alumínio exibiam mudanças em seu fenótipo e função. As alterações de fenótipo observadas são semelhantes à de células dendríticas, eles também podem

induzir respostas imunológicas de memória específica do antígeno do tipo MHC de classe II, tais resultados demonstram que os macrófagos são sensíveis às vacinas com adjuvantes a base de alumínio.

Além disso os adjuvantes a base de alumínio podem ativar a resposta imune celular através da via do inflamossoma NLRP3, que promovem a liberação de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, sendo IL-1B e IL-18, ativando assim vias inflamatórias e recrutamento de células leucocitárias, resultando em uma resposta imunológica mais forte (Li et al., 2007). Além disso, adjuvantes a base de alumínio tem papel importante no recrutamento e mobilização de monócitos inflamatório para local da imunização, também podem facilitar a diferenciação dos monócitos inflamatórios observados em resultados *in vitro*. O recrutamento de monócitos pelo adjuvante demonstrou também expressão de níveis mais altos de MHC de classe II. Além disso, está diferenciação dos monócitos facilitam a ida para linfonodo e induzir intensa proliferação de células-T (Tritto et al., 2009).

Estudos indicaram também aumento de citocinas pro-inflamatória, como TNF- α , estão elevados em camundongos imunizados com o adjuvante hidróxido de alumínio e patógeno contra hepatite B como antígeno. No mesmo estudo foi observado aumento na citocina IL-10, o que indica ação estimulatória do adjuvante a base de alumínio, que pode ativar respostas imunes, e então levar a função terapêutica esperada (Wang et al., 2013). Em contrapartida o hidróxido de alumínio tem efeito neurotóxico em camundongos dose dependente, isto demonstra uma nova visão no campo da segurança do adjuvante a base de alumínio (Crepeaux et al., 2017).

No período de 3 semanas as NPAu e lipossoma também elevaram o nível de anticorpos comparado com os grupos controles, mas a utilização de adjuvante tradicional demonstrou ser mais efetivo até o momento. Malaczewska 2015, viu que efeito de NPAu administrado via oral em células leucociticas levou a um aumento na atividade dos fagócitos e alteração na população dos linfócitos. A atividade aumentada dos granulócitos e monócitos foi por um curto período após a administração da NPAu, que supostamente pode ser um indicativo da adaptação do organismo a presença deste material. Também foi observado que não ocorreram alterações fenotípicas entre os linfócitos até 28 dias após o contato com NPAu. Os autores também citam a importância de maiores estudos para verificar de forma mais detalhada tais resultados observados (Malaczewska, 2015).

Quando avaliamos 6 imunizações (semana 7) verificamos que grupo NPAu + LiHyA obteve um nível de anticorpos sem diferença estatística em relação ao grupo adjuvante AlOH₃. O mesmo ocorre com grupo que utiliza lipossoma como adjuvante. Tal efeito dos níveis de anticorpos aumentado quando utilizando os nanomateriais pode ser pelo tipo de resposta do sistema imune.

Nanopartículas reagem influenciando de maneira mais forte a captação celular, e as respostas imunes mais efetivas, levando a proliferação de linfócitos. Em contraste nanopartículas induziram maturação de células imunológicas com ativação mediada por células Th1 e a proliferação de linfócitos-T, de maneira dose-dependente. Outro ponto importante é a indução a proliferação de células natural killer, seguindo o aumento considerável nos níveis de secreção de citocina pró-inflamatória, sugerindo que pode representar uma ferramenta para moldar imunidade adaptativa, e aumentar títulos de anticorpos (Xavier et al., 2015).

Outro ponto a ser levado em consideração é as alterações morfológicas das NPAu, pois podem influenciar positivamente a resposta imunológica desejável e esses parâmetros devem ser estudados e levados em consideração para posterior aplicação biológica. Um exemplo seria a utilização de polietilenoglicol em sua superfície, tal modificações de superfície proporciona inibição da interação com a superfície do nanomaterial, assim sem interação com proteínas orgânicas ou ação imunomoduladora, assim não levando a uma ativação imune e por consequente não aumentando títulos de anticorpos (Chen; Gao, 2017). Diante deste fato as nanopartículas utilizados como adjuvantes neste projeto, possuíam características morfológicas já descritas na literatura com possível ação imunoestimulatória, isso soma e agregada valor sobre os nossos resultados obtidos sobre aumento no título de anticorpos.

Com o intuito de verificar qual adjuvante consegue manter o título de anticorpo a longo prazo sem imunizações neste período, foi quantificado o título de anticorpos após 5 meses da última imunização. O efeito a longo prazo das imunizações demonstrou que ocorre uma queda nos níveis de anticorpos para todos os grupos testados, mas os nanomateriais utilizados neste projeto mantiveram níveis maiores que o adjuvante AlOH₃, demonstrando ser um potencial adjuvante para uso a longo prazo.

Os efeitos a logo prazo na produção de anticorpos já foram verificados demonstrado também em outros estudos utilizando NPAu e lipossoma,

funcionalizadas com antígeno específico. Na literatura já tem estudos com outros antígenos e NPAu, sendo que tais estudo utilizam uma previa ligação do nanomaterial com o antígeno utilizado (Dykman et al., 2004). Tal ligação faz com que o nanomaterial vire carreador do antígeno e podendo não ter o mesmo efeito para diferentes moléculas a serem usadas para produção de anticorpos.

Gregoriadis et al., em 1974, demonstrou que lipossomas já havia atividade adjuvante, após observar potentes respostas imunológicas de anticorpos contra os antígenos, como o toxóide da difteria, em camundongos vacinados. Em contrapartida, os animais vacinados não demonstraram sinais de granulomas nos locais da aplicação e nem hipersensibilidade, o que normalmente ocorre nos adjuvantes convencionais (Allison; Gregoriadis, 1974).

A ligação de um nanomaterial com outras moléculas podem não ocorrer e/ou ocorrer alterando a sua estrutura, assim podendo não causar o efeito desejado. Para isso o estudo de diferentes estruturas de antígenos e modelos de utilização diferentes vem sendo estudado. Além disso o menor efeito celular tóxico do adjuvante associado a um melhor efeito na produção de anticorpos tende a uma área que pesquisa necessária para utilização em futuras vacinas.

Nossos resultados sobre efeito celular da administração dos nanomateriais sobre os tecidos analisados observaram que somente no tecido do fígado teve um aumento considerável na carbonilação proteína, sendo marcador de dano proteico, quando administrado hidróxido de alumínio. Tal processo pode estar ocorrendo pois no fígado onde grande parte dos fármacos e substâncias são metabolizados, este processo pode ter gerado a alteração observada.

Tais resultados são corroborados por outros trabalhos, que utilizam NPAu e lipossomas em animais, não identificando aumento no dano celular. A utilização de nanopartículas via subcutâneo em modelo de camundongos, não demonstrou aumento de dano celular, além de mostrar uma melhora nos parâmetros oxidativos celular. (Hauptenthal et al., 2020). Também demonstrando a segurança do uso de nanopartículas um estudo que utiliza NPAu via intraperitoneal não demonstrou alteração nos níveis de carbonilação proteica. Tal estudo demonstrou que não a alteração nos parâmetros oxidativos, utilizando concentrações de 2,5mg/Kg de NPAu (Muller et al.,2017).

O efeito a longo prazo da exposição adjuvante demonstrou um aumento do dano em proteínas causados pela NPAu quando analisado no baço, este processo

de dano celular pode ter ocorrido pelo fato da NPAu acabar acumulando mais facilmente no baço, além de também pela possibilidade de ter o efeito de acúmulo em células leucocitária, visto que poderia estar interagindo com proteína que posteriormente será fagocitada (Zhang et al.,2019).

Embora de observamos um alteração do parâmetro de dano oxidativo no grupo NPAu, os efeitos das NPAu sobre dano oxidativo já foi demonstrado com possível ação antioxidante e possível ação anti-inflamatório em modelos de trauma muscular e lesão muscular. Tais efeitos foram avaliados com concentrações baixas de nanopartículas e ação tópica local das NPAu (Dohnert et al.,2012; Victor et al.,2012). Considerando a via de administração similar a utilizada neste projeto, podemos considerar efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios das NPAu em modelo da doença Duchenne, o qual possui quadro inflamatório e de degeneração muscular. Em tal modelo as NPAu foram administradas via subcutânea e observaram diminuição dos parâmetros oxidativos e inflamatórios (Haupenthal et al.,2020).

Como observamos no nosso estudo os níveis de radicais livres, a curto prazo, não estão elevados no fígado e no baço, sendo que os grupos lipossoma e NPAu estão mais baixo que grupo controle, assim podemos sugerir que tal efeito de redução possa ser atribuída pela ação antioxidante das nanopartículas. Como já descrito anteriormente, tais nanomateriais utilizados neste trabalho já apresentam ação antioxidante, reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio, sendo que tal redução não deixa ocorre desbalanço entre os níveis oxidantes, antioxidantes e dano celular, assim não ocorrendo estresse oxidativo (Dohnert et al.,2012; Victor et al.,2012; Haupenthal et al.,2020)

O mesmo resultado não foi observado nos demais tecidos, mas em contrapartida observamos um aumento nos níveis de radicais livres no tecido rim quando utilizado $Al(OH)_3$. Tais resultados encontrados são coerentes quando analisamos a literatura, que discute o fato que alumínio induz citotoxicidade e aumento de radicais livres. Ainda sim neste mesmo trabalho foi demonstrado possíveis efeitos genotóxicos e carcinogênicos dos sais a base de alumínio (Willhite et al.,2014).

A longo prazo nossos resultados demonstraram que grupo lipossoma está alterado produzindo o nível maior de radicais livres em relação ao grupo controle, somente no tecido baço. O efeito do lipossoma pode ser atribuído pela metabolização do material, além do fato que lipossoma pode estar liberando

lentamente o material permanecendo por mais tempo, vale ressaltar que esta alteração não foi alta suficiente para causar dano nas células, como já verificamos com as análises de dano celular.

Outro ponto é que a possibilidade de interação dos lipossomas com NADPH oxidase, sendo um mecanismo de geração de radicais livres o qual já foi discutido no estudo de Yan et al., (2008).

O sistema antioxidante celular analisado logo após a última imunização e após período de 5 meses e observamos um aumento da atividade da enzima SOD nos tecidos do rim e do fígado quando utilizamos NP Au e lipossoma como adjuvante, no período após a última imunização, sendo este processo pode ser atribuído pelo fato de estar em duas vias importantes, uma de metabolização e outra de excreção. O mesmo não ocorreu após 5 meses, observamos um aumento da atividade da SOD no baço quando utilizamos NP Au, tal ação corrobora com o aumento já descrito do dano proteico com os mesmos parâmetros.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a utilização de nanomateriais com atividade adjuvante pode ser melhor que adjuvante convencional a base de alumínio, visto que ele produz um título de anticorpo IgG por mais tempo. Também podemos observar que sobre parâmetros oxidativos nanomateriais mostram mais confiáveis. Tais resultados nos levam uma nova ideia de utilização de NPAu e lipossomas como adjuvantes, sendo uma alternativa para adjuvantes convencionais já utilizados. Entretanto, é necessário a investigação mais aprofundada sobre o mecanismo de ação e ativação do sistema imune, tendo em vista que tais materiais podem ter ações distintas como anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora.

REFERÊNCIAS

Aiyer HP, Ashok KHG, Kumar GP, Neeta S. An Overview of Immunologic Adjuvants - A Review. *J Vaccines Vaccin.* 4:1. 2013.

Allison AG, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature.* 252:252. 1974.

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* Feb 22;8(1):102. 2013.

Ambrosio RP. Predição e caracterização de epítomos de proteínas hipotéticas e funcionais de leishmania spp. Aplicados no diagnóstico sorológico das leishmanioses tegumentar e visceral. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2019.

Andreasen LV, Hansen LB, Andersen P, Agger EM, Dietrich J. Aluminium hydroxide potentiates a protective Th1 biased immune response against polio virus that allows for dose sparing in mice and rats. *Vaccine.* 2015 Apr 8;33(15):1873-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.02.011. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25698487.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1269-81.

Apostólico Jde S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res.*2016:1459394. 2016.

Attallah AM, Tabll AA, Ismail MF, Ibrahim AS, El-Dosoky I. Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood T-lymphocyte Subsets in Colon Cancer. *International Journal of Cancer Research.* 2: 409-414. 2006.

Balasubramanian SK, et al., Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials* 31, 9023-9030. 2010.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1289-1306. 2008.

Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1759 - 1782. 2009.

Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 125(Suppl 2):S33-40. 2010.

Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvants—a brief overview. *Immunol Lett.* 128:29-35. 2010.

Brown CL, Whitehouse MW, Tiekink ER, Bushell GR. Colloidal metallic gold is not bio-inert. *Inflammopharmacology*. 16(3):133-7. 2008.

Chen X, Gao C. Influences of size and surface coating of gold nanoparticles on inflammatory activation of macrophages. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Dec 1;160:372-380. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.046. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28963958.

Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, et al., Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(1):1–10.

Costa LE, Lima MIS, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Martins VT, Duarte MC, et al., Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(1):96–106.

Crépeaux G, Eidi H, David MO, Baba-Amer Y, Tzavara E, Giros B, Authier FJ, Exley C, Shaw CA, Cadusseau J, Gherardi RK. Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. *Toxicology*. 2017 Jan 15;375:48-57. doi: 10.1016/j.tox.2016.11.018. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27908630.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*. 104(1):293-346. 2004.

Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel)*. Apr 16;3(2):320-43. 2015.

dos Santos MC, Micheletto YMS, da Silveira NP, et al., Self-assembled carbohydrate-based vesicles for lectin targeting. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 148:12–18. 2016.

Dreaden EC, Alkilany AM, Huang G X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 41(7):2740-79. 2012.

Duran N. et al., Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 1ª ed. São Paulo. Artliber. 2006.

Faraday M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philos. Trans. R. Soc. Lond*. 147; 145-181. 1857.

Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry*. 8(11):1081-3. 1971.

Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug Discov. Today*. 122 128. 2015.

Gao W; et al., Effect of gold nanoparticles on glutathione depletion-induced hydrogen peroxide generation and apoptosis in HL7702 cells. *Toxicol Lett.* 10;205(1):86-95. 2011.

Garlapati S. Do we know the Th1/Th2/Th17 determinants of vaccine response? *Expert Rev. Vaccines* 2012, 11, 1307–1310.

Gobbi M, Re F, Canovi M, Beeg M, Gregori M, Sesana S, Sonnino S, Brogioli D, Musicanti C, Gasco P, Salmona M, Masserini ME. Lipid-based nanoparticles with high binding affinity for amyloid-beta1-42 peptide. *Biomaterials.* Sep;31(25):6519-29. 2010.

Hackett CJ, Harn DA, *Vaccine Adjuvants: Immunological and Clinical Principles*, Humana Press, Totowa, NJ, 2006.

Institute of Medicine and National Research Council. *Vaccine Supply and Innovation*. Washington, DC: The National Academies Press. 1985. <https://doi.org/10.17226/599>.

Kesavan A, Venkatraman G. *Nanotechnology and its Applications*. The Scitech Journal. Vol 01(06) 12-13. 2014 .

Kewal K, Jain MD. *The Handbook of Nanomedicine*. Jain PharmaBiotech. 2008.

Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B.* 17;110(32):15700-7. 2006.

Kroetz T, dos Santos MC, Beal R, et al., Proton transfer in fluorescent secondary amines: synthesis, photophysics, theoretical calculation and preparation of photoactive phosphatidylcholine-based liposomes. *Photochem Photobiol Sci* 18:1171–1184. 2019.

Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol* 2007; 178:5271-6; PMID:17404311; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5271>

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+ T cells: Differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012.

Marrack, P.; McKee, A.S.; Munks, M.W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* 2009, 9, 287–293.

Małaczewska J. Effect of oral administration of commercial gold nanocolloid on peripheral blood leukocytes in mice. *Pol J Vet Sci.* 18(2):273-82. 2015.

Micheletto YMS, da Silveira NP, Barboza DM, et al., Investigation of self-association between new glycosurfactant N-acetyl-β-d-glucosaminyl-PEG-docosanate and

soybean phosphatidylcholine into vesicles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 467:166–172. 2015.

Mitchell AR. Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: a historical assessment. *Biopolymers*. 175 - 184. 2008.

Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science; 2007.

Mortimer EA. Immunization against infectious disease: active immunization programs are endangered by complacency and litigation. *Science* 200:902-907. 1978.

Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine*. 28, C2–C13. 2010.

Minor PD. Modern approaches to vaccines: molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 6, 264–265. 1985. doi:10.1016/0165-6147(85)90122-1

Mukherjee P; et al., Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical cancer research* 11: 3530–3534. 2005.

Nevagi RJ, Toth I, Skwarczynski M. Peptide-based vaccines. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. 327-358. 2018.

Nikalje A.P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med chem*. 5:2. 2015.

Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Ver Vaccines*. 9:1095–107. 2010.

Pasquale AD, Preiss S, Silva FTD, Garc N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond, *Vaccines* 3. 320-343. 2015.

Quina FH. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Química Nova*. 27[6]: 1028-1029. 2004.

Rezaei N, Mehrnejad F, Vaezi Z, Sedghi M, Asghari SM, Naderi-Manesh H. Encapsulation of an Endostatin Peptide in Liposomes: Stability, Release and Cytotoxicity Study. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*. 2019

Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, Sauzeat E, Fournier JG, Clayette P, Siegrist CA, et al., Aluminum hydroxide adjuvante induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine* 2004; 22:3127-35; PMID:15297065; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.061>

Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of Isoenzymes. Suggestions for a New Classification. *Ann Parasitol Hum*. 1990;65(3):111–25.

Santos FLN, De Souza WV, Da Silva Barros M, Nakazawa M, Krieger MA, De Miranda Gomes Y. Chronic Chagas disease diagnosis: A comparative performance of commercial enzyme immunoassay tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(5):1034–9. Shehata T, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 359:272–279. 2008.

Shen Y, Hao T, Ou S, Hu C, Chen L. Applications and perspectives of nanomaterials in novel vaccine development. *Medchemcomm.* 2017 Oct 17;9(2):226-238. doi: 10.1039/c7md00158d. PMID: 30108916; PMCID: PMC6083789.

Shi Y, HogenEsch H, Regnier FE, Hem SL. Detoxification of endotoxin by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine* 2001; 19:1747-52; PMID:11166900; [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00394-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00394-7)

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

Signorell RD, Luciani P, Brambilla D, Leroux JC. Pharmacokinetics of lipid-drug conjugates loaded into liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018 Jul;128:188-199. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.04.003. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29678733.

Smith DM, Simon JK, Baker JR Jr. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol.* Aug;13(8):592-605. 2013. doi: 10.1038/nri3488.

Srivastava P, Gidwani K, Picado A, Auwera G Van der, Tiwary P, Ostyn B, et al., Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas of Bihar, India. *Trop Med Int Heal.* 2013;18(5):548–54.

Tandrup Schmidt S, Foged C, Korsholm KS, Rades T, Christensen D. Liposome based adjuvants for subunit vaccines: formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. *Pharmaceutics.* 8. 2016.

Taylor MW. The History of Immunology. *Viruses and Man A History of Interactions,* 77–99. 2014.

Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 2009; 27:3331-4; PMID:19200813; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.084>

Turkevich J; et al., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–60. 1951.

Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(Suppl 2):S24–32.

Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* Jul;70(2):95-111. 1995.

Xavier Le Guével, Francisca Palomares, María Torres, Miguel Blanca, Tahia Fernandez, et al.. Nanoparticle size influences the proliferative responses of lymphocyte subpopulations. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, 2015, 5 (104), pp.85305-85309. [ff10.1039/c5ra16164aff](https://doi.org/10.1039/c5ra16164aff). [ffhal-02338001](https://doi.org/10.1039/c5ra16164aff)

Wang XY, Yao X, Wan YM, Wang B, Xu JQ, Wen YM. Responses to multiple injections with alum alone compared to injections with alum adsorbed to proteins in mice. *Immunol Lett* 2013; 149:88-92; PMID:23183095; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.11.005>

Wang N, Chen M, Wang T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. *J Control Release*. 2019 Jun 10;303:130-150.

Whitesides GM. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol*. 21(10):1161-5. 2003.

WHO. World Health Organization – Immunization. Disponível em: [<https://www.who.int/topics/immunization/en/>](https://www.who.int/topics/immunization/en/). Acessado em: 07 nov. 2019.

Wilson KL, Xiang SD, Plebanski M. Inflammatory/Noninflammatory Adjuvants and Nanotechnology—The Secret to Vaccine Design. *Micro and Nano Technologies*. 99-125. 2017.

Yan, W., Chen, W., & Huang, L.. Reactive oxygen species play a central role in the activity of cationic liposome based cancer vaccine. *Journal of Controlled Release*, 130(1), 22–28. 2008.