

David José Caetano Coelho

Nanotecnologia & vacinologia:
vias de internalização das nanopartículas e apresentação cruzada

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Fevereiro 2017







**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA
VIDA** FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Nanotecnologia & vacinologia: vias de internalização das nanopartículas e apresentação cruzada

Dissertação apresentada à
Universidade de Coimbra para
cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica, realizada sob
a orientação científica da Professora
Doutora Olga Borges (Universidade
de Coimbra) e co-orientada pelo
Professor Doutor Paulo Santos

David José Caetano Coelho

2017



Em termos absolutos, o homem é um valor imponderável, inteiro e perfeito como um dogma. Mas em termos relativos, sociais, o homem é o que vale para os seus semelhantes. E é na contradição de medida que vai de próximo a próximo que consiste o drama de ninguém conseguir ser ao mesmo tempo amado em Tebas e Atenas.

Miguel Torga, 1949



Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus familiares, o meu pai e a minha mãe, pela compreensão, pela paciência, pelo apoio, por tudo o que fizeram, pelo que não fizeram, por tudo o que ainda fazem, e nunca deixarão de fazer.

Quero também agradecer à minha orientadora, a Professora Olga Borges, por me ter aceite no seu grupo, e por ter acreditado continuamente em mim, mesmo quando não tinha razões para isso.

Em último lugar, não posso deixar de “aplaudir” todos os meus amigos (eles sabem quem são!) e todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o meu sucesso.



Índice

Agradecimentos

Índice

Abstract/Keywords

Resumo/ Palavras-chave

Abreviaturas

1. Caracterização de Nanopartículas e aplicação na vacinação

1.1 Definição de NPs; perspectiva histórica

1.2 Tipos de nanopartículas

1.2.1 Nanopartículas Poliméricas

1.2.2 Lipossomas

1.2.3 Nanopartículas inorgânicas

1.2.3.1. Os diversos tipos de nanopartículas inorgânicas

1.2.3.2. Atividade anti-microbiana das Nanopartículas inorgânicas

1.2.3.3. Toxicidade associada às Nanopartículas inorgânicas

1.2.4 Partículas derivadas de vírus

1.2.4.1 Vírus como transportadores de moléculas biologicamente ativas

1.2.4.2. Partículas tipo vírus

1.3 Nanopartículas e as vantagens da sua aplicação em vacinas



2. Internalização de nanopartículas por parte das células

2.1 Tipos de vias de internalização de nanopartículas

2.2 Vias fagocíticas

2.3 Vias pinocíticas

2.3.1 Macropinocitose

2.3.2 Endocitose mediada por clatrina

3. Influência do mecanismo de internalização na resposta imunológica a antígenos encapsulados em nanopartículas: vias de apresentação cruzada (*cross-presentation*)

Conclusão

Referências bibliográficas



Abstract

Nanomaterials are held as an advent for new therapies, either in the delivery of drugs or antigens or on the transportation of agents applied in imaging. In the last decades, nano-sized particles emerged based on biocompatible and biodegradable materials, in tune with knowledges from areas such as human physiology, intracellular biochemistry or biophysics. This synergetic process resulted in new materials more efficient on performing their tasks.

Nanoparticle reduced toxicity is required for medical applications. The knowledge of the mechanisms that allow particles enter the cells would contribute to understand better the particle cytotoxicity mechanisms and thus allows the design of safe nanoparticles. A very prominent topic that helps to contribute to the development of safer but simultaneously effective vaccines is the antigen cross-presentation phenomena.

The purpose of this Review is to establish valuable relationships between the physicochemical characteristics of some of the most common nanomaterials, its profile of internalization by different cell types, including immune system cells, and an immune response that can be generated. This topic is of foremost importance for the development of therapeutic vaccines for chronic diseases like cancer or malaria.

Key-words: nanoparticles, endocytosis, vaccines, antigen presenting cells, cross-presentation



Resumo

Os nanomateriais assumem-se como um advento para novas terapias, quer na entrega de fármacos ou no transporte de agentes de contraste aplicados em imagiologia. Nas últimas décadas, partículas na ordem dos nanómetros têm sido desenvolvidas baseadas em materiais biocompatíveis e biodegradáveis, em sintonia com os conhecimentos de fisiologia humana, de bioquímica intracelular ou de biofísica, que permitem aumentar a eficiência da tarefa a que estas se propõem.

Para formular materiais mais eficazes nas aplicações médicas, torna-se importante diminuir a eventual toxicidade associada às nanoestruturas e os perigos resultantes para os tecidos-alvo; o conhecimento dos mecanismos pelos quais estas partículas chegam às células e são internalizados contribui para tal.

Um tópico muito em evidência na atualidade que poderá contribuir para o desenvolvimento de vacinas mais seguras, mas simultaneamente eficientes na modulação da imunidade é a apresentação cruzada de antigénio, que se define como uma mais-valia para as células apresentadoras de antigénio (APC) controlarem a imunidade celular face a partículas de origem externa que constituam um potencial perigo para a homeostasia do organismo.

Neste trabalho de revisão tentam-se estabelecer relações entre as características físico-químicas de alguns dos materiais particulados mais usados em ensaios pré-clínicos, o seu método de internalização por diferentes tipos de células, entre os quais células do sistema imunitário, e a resposta imunitária que poderá ser gerada. Um dos benefícios poderá ser o surgimento de novas formas de combate a enfermidades relacionadas com o sistema imunitário, e que há muito que são um problema para uma larga franja da população mundial, como o cancro ou a malária.

Palavras-chave: nanopartículas; endocitose; vacinas; células apresentadoras de antigénio; apresentação cruzada de antigénios





Abreviaturas

APCs	Células apresentadoras de antigénio
ATP-ase	Adenosinatrifosfatase
BSL	Biosafety Levels (Níveis de Biosegurança)
Ca ²⁺	Catião Cálcio
Cl ⁻	Anião Cloro
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g-PGA	g-PGA
IgG	Imunoglobulina G
NPs	Nanopartículas
NK	Natural Killer
PEG	Poli-(etileno glicol)
PEI	Polietilenimina
PLG	Poli (D, L-lactido-co-glicólido)
PLGA	Ácido poli (D, L-lático-co-ácido glicólico)
QD	<i>Quantum-Dots</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TAP	Transportador associado com o transporte de antigénio
VLPs	Partículas tipo vírus



1. Caracterização de Nanopartículas e aplicação na vacinação

1.1 Definição de nanopartículas e perspetiva histórica

A Nanociência tem como objeto de estudo os materiais na escala nanométrica, sendo a Nanotecnologia responsável pelo desenvolvimento e produção de novos materiais de tamanho nano que respondam às necessidades do Homem [J Am Chem Soc. 2012 Sep 26;134(38):15607-20].

A definição de nanopartículas (NPs) restringe esta designação a materiais na ordem máxima dos 100 nm em pelo menos uma coordenada (Dobrovolskaia, McNeil, & World, 2013; Rawat, Singh, Saraf, & Saraf, 2006; Uskokovic, 2013). No entanto, é comum encontrar na literatura científica o termo “nanopartículas” referido a material particulado com tamanho médio inferior a 1000 nm (Singh & Lillard, 2009; Wang et al., 2011). De qualquer das formas, é curioso constatar que uma NP de 10 nm de diâmetro é 10 milhões de vezes mais pequena que uma bola de ténis (Figura 1) [J Leukoc Biol. 2005 Sep;78(3):585-94]!

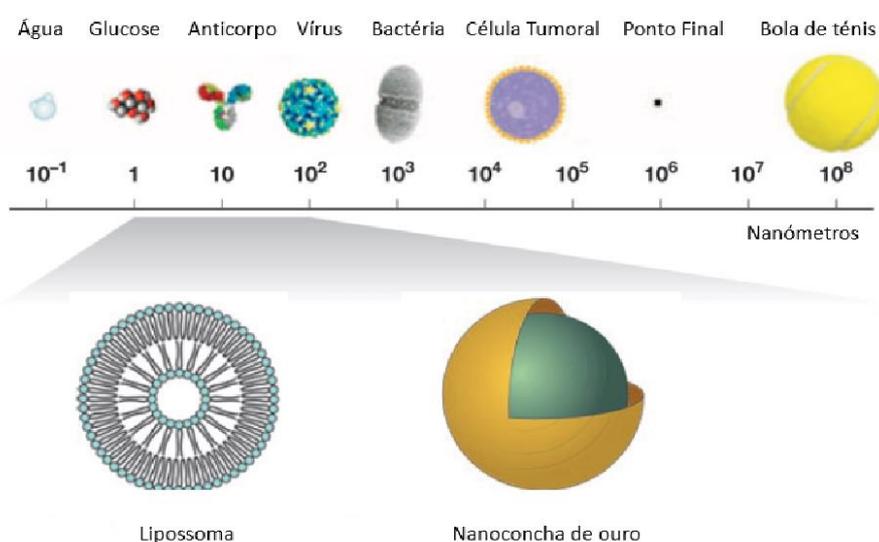


Figura 1- Comparação do tamanho de alguns tipos de nanopartículas com moléculas químicas, seres vivos e objetos comuns. Adaptado de McNeil, 2005.

Os nanomateriais, termo usado de forma contínua e indiscriminada com NPs (alguns autores advogam que as “nanopartículas” são os nanomateriais que tenham uma forma aparentemente esférica [J Am Chem Soc. 2012 Sep 26;134(38):15607-20]) são alvo de um interesse especial por possuírem características físico-químicas únicas [Anal Bioanal Chem. 2009 Jan;393(1):81-95]. Estes materiais têm aplicações em diversas áreas



especializadas, entre as quais o Ambiente, a Indústria Militar e a Medicina (Tabela 1). A Nanotecnologia é assim uma ciência que intersecta os conhecimentos de muitas áreas de estudo, desde a Física, a Química, a Biologia ou a Medicina, até à Eletrónica e à Informática [History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress], quebrando as fronteiras tradicionais entre estes domínios [Mol Pharm. 2011 Dec 5;8(6):2101-41].

Tabela 1- Exemplos de aplicações das Nanopartículas. Adaptado de Farré, 2009 e de Bhatia, 2016.

Área de estudo	Produtos onde as Nanopartículas são aplicadas
Ambiente	Novos sistemas de filtração de água e ar, novas formas de tratamento de resíduos tóxicos.
Energia	Células fotovoltaicas, baterias mais eficientes.
Informática	Novos <i>chips</i> e dispositivos de armazenamento.
Medicina	Novas formas farmacêuticas de utilização na terapêutica e no diagnóstico.
Militar	Armas, biossensores.
Química	Tintas, plásticos, produtos de limpeza.

Apesar da Nanotecnologia parecer uma ciência recente, já no Império Romano se usavam NPs na composição de objetos de ornamentação como se observa na Taça de Lygurgus (Figura 2). É comum encontrarmos exemplos de materiais nanoparticulados na Natureza, desde as cinzas emitidas pelos vulcões em erupção, às moléculas empregues nas reações bioquímicas que ocorrem no interior das células dos seres vivos [Anal Bioanal Chem. 2009 Jan;393(1):81-95]. Podemos é considerar a Nanotecnologia uma ciência recente se tivermos em conta o seu foco no desenvolvimento racional de produtos que satisfaçam as nossas carências quotidianas.

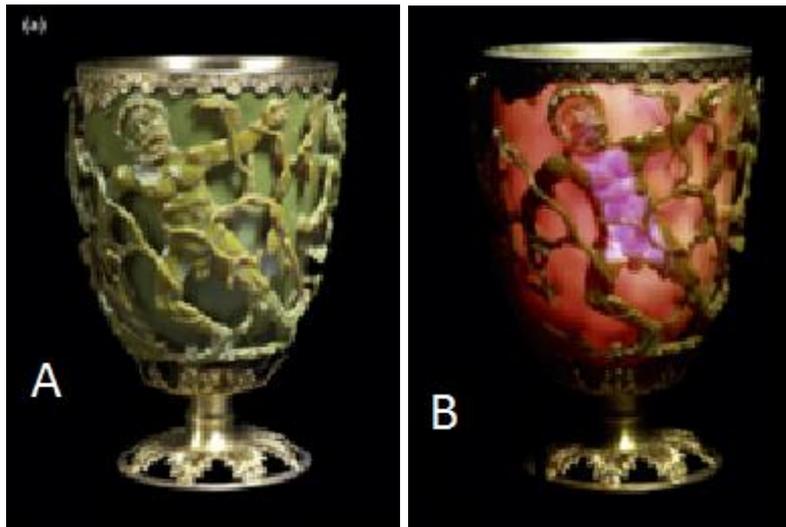


Figura 2- Taça de Lycurgus, datada do século IV d.C. NPs de ouro e prata são responsáveis por este curioso fenómeno ótico: quando a luz (visível) incide no exterior da taça, esta exhibe uma coloração esverdeada (A); quando se ilumina a taça a partir do seu interior, esta adquire tons avermelhados, e a figura mitológica representada torna-se lilás (B). Adaptado de Heiligtag, 2013.

Uma das áreas de aplicação da Nanotecnologia que mais tem beneficiado com a evolução dos nanomateriais é a Medicina, o que originou a Nanomedicina, que por definição, tem por objetivo “a projeção de métodos de diagnóstico e/ou terapia à nanoescala para o tratamento, prevenção e diagnóstico de doenças” [Chem Soc Rev. 2012 Apr 7;41(7):2545-61].

Estes nanomateriais com aplicação na clínica são, assim, particularmente úteis quando são utilizados como agentes de contraste/ vetores de agentes de contraste (em diagnóstico e imagiologia) (Kim et al., 2011; Liong et al., 2008), no transporte de fármacos, como acontece no tratamento do cancro (He et al., 2011; Wang et al., 2011), ou, ainda, sob a forma de vacinas gerando resposta imunológica no organismo (Li et al., 2013; Reddy et al., 2007). Em particular, as NPs oferecem proteção, internalização em células (capacidade de atravessar barreiras como membranas), e vectorização do fármaco/antígeno a elas associado (entrega direcionada e específica dos compostos), bem como a sua libertação lenta e controlada (Dobrovolskaia, Shurin & Shvedova, 2016; Gordon, Saupe, McBurney, Rades & Hook, 2008; Panyam & Labhasetwar, 2003; Rawat et al., 2006). Estas capacidades atuam de forma sinérgica permitindo que os compostos assim veiculados se concentrem em maior quantidade no seu alvo, originando menos danos nos tecidos saudáveis [Cell Mol Life Sci. 2009 Sep;66(17):2873-96].

Este conceito de um transportador pequeno o suficiente para entrar no organismo e exercer o seu efeito benéfico sem prejuízo dos tecidos sãos teve como base a idealização de um “*magic bullet*” por Paul Ehrlich, nos primórdios do século XX [Nat Rev Cancer. 2008 Jun;8(6):473-80]. Desde então, a comunidade científica empreendeu um grande



esforço no sentido de concretizar algo que somente nos anos 70/80 deixou de constituir um elemento completamente inovador em colóquios científicos [Int J Pharm. 2007 Feb 22;331(1):1-10]...

1.2 Tipos de nanopartículas

Os nanosistemas resultam de uma combinação de diferentes materiais, quer de índole orgânica ou inorgânica, quer de origem natural ou sintética. Pequenas modificações na sua estrutura podem originar materiais com propriedades e aplicabilidades completamente diferentes. Alguns destes materiais podem ser biodegradáveis e biocompatíveis, outros não [Cell Mol Life Sci. 2009 Sep;66(17):2873-96] e este facto é particularmente relevante em nanomedicina.

1.2.1 Nanopartículas Poliméricas

As NPs de base polimérica são um dos tipos de NPs mais investigados em ciência, tendo a sua estrutura composta por polímeros constituídos por vários monómeros [Colloids Surf B Biointerfaces. 2010 Jan 1;75(1):1-18]. Em relação à origem, podem usar-se polímeros naturais, ou sintéticos. Alguns destes polímeros beneficiam do facto de serem biodegradáveis, resultado da sua metabolização no organismo e fácil excreção, o que reduz ou anula a sua eventual toxicidade [Chem Rev. 2016 Feb 24;116(4):2602-63].

Um grande número de polímeros sintéticos tem sido utilizado na preparação de nanopartículas, tal como poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLG), ácido poli (D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poli-(γ -glutâmico) (g-PGA), polietilenoglicol (PEG) ou poliestireno [22, 24, 31, 33]. As nanopartículas à base de PLG e PLGA têm sido as que maior interesse suscitaram à comunidade científica devido ao seu elevado grau de biocompatibilidade e biodegradabilidade, bem como possibilitarem, através da ligação de determinados ligandos, a entrega direcionada das moléculas ativas transportadas e a sua libertação lenta e controlada [36].

O PLGA tem sido empregue na síntese de nanopartículas destinadas ao transporte de antigénios provenientes de um vasto rol de micro-organismos, incluindo *Plasmodium vivax* [37], “vírus da hepatite B” [22], *Bacillus anthracis* [29] ou simplesmente antigénios-modelo como ovalbumina e o toxóide do tétano, submetida a tratamento para inativação) [26,27].

As NPs de poliestireno podem ser conjugadas com uma grande variedade de antigénios [Bioconjug Chem. 1995 Sep-Oct;6(5):507-11], [J Immunol. 2004 Sep 1;173(5):3148-54], uma vez que diferentes grupos químicos funcionais podem ser adicionados à sua superfície, como grupos amina ou grupos carboxílicos [ACS Nano. 2011 Mar 22;5(3):1657-69], [33,38].

Na preparação de NPs, também se têm usado polímeros naturais à base de polissacarídeos, como o alginato de sódio [Int J Pharm. 2005 Aug 11;299(1-2):155-66],



[41] e o quitosano [Methods Mol Biol. 2016;1404:697-713], [49]. Em particular, as nanopartículas à base de quitosano têm sido amplamente estudadas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, natureza não-tóxica e facilidade em serem modificadas nas formas e tamanhos desejados [31], [Int J Pharm. 2007 Jun 7;337(1-2):254-64]. Estas nanopartículas têm sido usadas na preparação de várias vacinas, incluindo vacinas contra o vírus da hepatite B [49] e vacinas de DNA [ScientificWorldJournal. 2012;2012:938457], [44, 47].

Além da possibilidade das NPs poliméricas transportarem antígenos e ácidos nucleicos, também lhes é reconhecido o mérito no transporte de fármacos contra o cancro [J Control Release. 2002 Oct 4;83(2):273-286], diabetes [Pharmazie. 2006 Jul;61(7):613-7] ou desequilíbrios hormonais [J Control Release. 2007 May 14;119(1):77-85].

1.2.2 Lipossomas

Os lipossomas (Figura 3) são estruturas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos em redor de um núcleo aquoso [Adv Drug Deliv Rev. 2008 May 22;60(8):915-28]. Estes fosfolípidos são biodegradáveis, não-tóxicos e não são imunogénicos (**From “Nanotechnology in vaccine delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 915–928**). As moléculas transportadas têm tendência a serem encapsuladas na região hidrofóbica se são de natureza hidrofóbica [Biomaterials. 2013 May;34(14):3626-38], ou na interface água-lípido ou no centro aquoso se têm algum carácter hidrofílico [Cancer Res. 1992 May 1;52(9):2431-9]. Os lipossomas aplicados na vacinação podem atuar como vetores de antígeno [91] e podem ser funcionalizados com as glicoproteínas dos envelopes virais, como do vírus *Influenza* [94], garantindo uma função imunoestimulante. As partículas resultantes apelidam-se de virossomas [92,93], e apenas se diferenciam do vírus original por não possuírem capsídeo nem material genético [Vaccine 27 (2009) 4381–4387] (Figura 4). Recentemente, têm sido desenvolvidos lipossomas no sentido de formular vacinas, quer profiláticas quer terapêuticas, contra a tuberculose [Biochim. Biophys. Acta 1718 (2005) 22–31.], [J Control Release. 2011 Sep 5;154(2):131-7], malária [Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1; 89(1): 358–362.] ou hepatite B [Nanomedicine. 2009;5:334–344.]. Os lipossomas também podem ser aplicados na terapia génica como transportadores de material genético [Gene Therapy (1998) 5, 930–937], no transporte e entrega de fármacos [J Control Release. 2004 Nov 5;100(1):135-44.] ou para efeitos de imagiologia [Int J Mol Sci. 2010; 11(4): 1759–1776.]

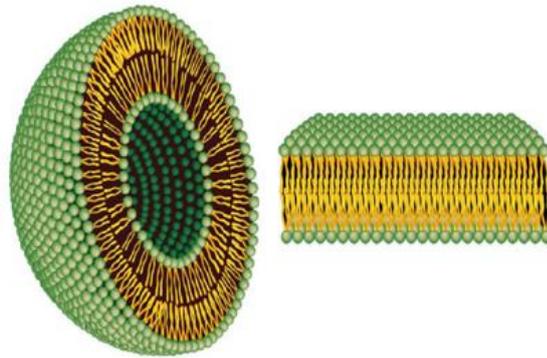


Figura 3- Ilustração de um lipossoma (à esquerda) e de uma bicamada fosfolipídica (à direita). Adaptado de Bozzuto, 2015.

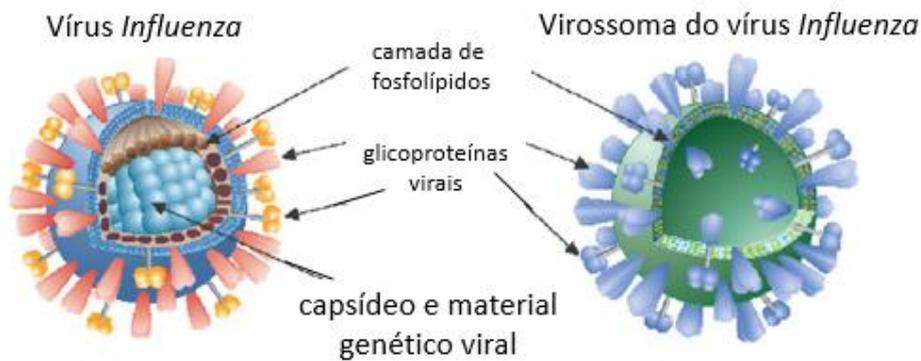


Figura 4- Ilustração de um virossoma derivado do vírus Influenza (à direita) e comparação com o vírus parental (à esquerda). Adaptado de Herzog, 2009.

1.2.3 Nanopartículas inorgânicas

Muitas NPs inorgânicas foram estudadas para o seu uso em vacinas, transporte de fármacos, imagiologia ou terapia génica [J Am Chem Soc. 2012 Sep 26;134(38):15607-20]. Salientam-se as NPs com propriedades magnéticas, NPs de origem metálica ou outros tipos de NPs à base de materiais inorgânicos, como as NPs de sílica.

1.2.3.1. Os diversos tipos de nanopartículas inorgânicas

a) Nanopartículas magnéticas



As NPs com propriedades magnéticas destacam-se por poderem ser direcionadas por ação de campos magnéticos externos para quaisquer zonas do organismo [Appl Radiat Isot. 2004 Dec;61(6):1255-9], bem como por serem facilmente manipuláveis em laboratório em termos de tamanho e forma [Nanomedicine. 2010 Feb;6(1):9-24]. As NPs magnéticas mais comumente relatadas são as NPs à base de óxidos de ferro [Angew Chem Int Ed Engl. 2008;47(29):5362-5], [Biomaterials. 2010 Aug;31(24):6317-24], embora as de cobalto [Chem Commun (Camb). 2005 Jan 7;(1):98-100] ou níquel [J Colloid Interface Sci. 2003 Mar 15;259(2):282-6] também mereçam referência.

As NPs magnéticas são maioritariamente utilizadas em diagnóstico [J. Mater. Chem., 2011,21, 15157-15162]. As suas propriedades magnéticas possibilitam a sua deteção em exames como a Ressonância Magnética (MRI) [J Biol Inorg Chem. 2004 Sep;9(6):706-12] ou a Tomografia por Emissão de Positrões (PET) [Bioconjug Chem. 2010 Apr 21;21(4):715-22]. No entanto, têm também sido utilizadas na entrega de fármacos [Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy], [Cancer Chemother Pharmacol. 2003 Jun;51(6):445-50], [IEEE Trans Nanobioscience. 2004 Mar;3(1):66-73] e como transportadores de material genético [Int J Nanomedicine. 2011; 6: 285–294], [Int J Nanomedicine. 2011; 6: 871–875].

NPs magnéticas, à base de ferro, podem ser aplicadas como teranósticos, aliando simultaneamente imagiologia e terapia em doenças como o cancro [Small. 2011 Aug 8;7(15):2241-9.] Este método diminui o período de tratamento, vital em termos clínicos, e abre portas ao desenvolvimento da medicina personalizada (ajustada às características de cada paciente) [Mol Pharm. 2011 Dec 5;8(6):2101-41], [Cancer Lett. 2013 Aug 9;336(1):8-17].

b) Nanopartículas metálicas

Metais como o ouro e a prata são atrativos para a síntese de NPs em virtude de serem materiais inertes e não-tóxicos [Vaccine 32 (2014) 327– 337], e ainda por gerarem nanomateriais de fácil preparação e passíveis de serem funcionalizados com grupos químicos que aumentam a sua estabilidade, como grupos sulfidrílicos ou amínicos [J. Am. Chem. Soc., 1998, 120 (48), pp 12696–12697]. Em particular, podem fabricar-se nanomateriais à base de ouro com diversas formas, como em bastonete, esféricas ou cúbicas [ACS Nano. 2013 May 28;7(5):3926-38], e com vários tamanhos (2-150 nm) [Front Cell Infect Microbiol. 2013 Mar 25;3:13], o que faz do ouro um material muito versátil. Esta adaptabilidade revê-se ainda no leque de aplicações que os nanomateriais de ouro encontram, entre as quais o transporte de antigénios [Nanotechnology. 2013 Jul 26;24(29):295102], [Nanomedicine (Lond). 2014 Feb;9(2):237-51], de material genético [Nano Lett. 2012 Apr 11;12(4):2003-12], [Smart PEGylated Gold Nanoparticles for the Cytoplasmic Delivery of siRNA to Induce Enhanced Gene Silencing] ou em diagnóstico [ACS Nano. 2010 Jul 27;4(7):3689-96].

Os nanomateriais de ouro podem ainda ser conjugados com uma variedade de outros materiais e partículas, originando nanoconchas contendo NPs de ferro no seu interior [J



Phys Chem C Nanomater Interfaces. 2010 Jan 1;114(45):19194-19201], lipossomas contendo NPs de ouro [Colloids Surf B Biointerfaces. 2006 Mar 15;48(2):112-8] ou nanoconchas de ouro-sílica [Breast Cancer Res Treat. 2010 Apr;120(3):547-55].

As nanoconchas de ouro-sílica (Figura 5) consistem num núcleo de sílica revestido por ouro [Mol Pharm. 2011 Dec 5;8(6):2101-41]. Foram as primeiras partículas de ouro a serem produzidas/otimizadas para tirarem partido da radiação do infravermelho próximo (Hirsch et al., 2003; Kennedy et al., 2011), que permite efetuar foto-hipertermia em locais específicos, nomeadamente em tumores (Chen et al., 2007; Huang, Jain, El-Sayed, & El-Sayed, 2008; Sperling, Rivera Gil, Zhang, Zanella, & Parak, 2008; Vallhov et al., 2006). A radiação visível/ infravermelho próximo absorvida pelas partículas provoca a excitação dos eletrões, seguindo-se o relaxamento destes e a emissão de energia (Chen et al., 2007; Sperling et al., 2008). Os efeitos sobre os tecidos são diversos; no entanto, considerando apenas o aumento de energia calorífica no tecido-alvo, observa-se a desnaturação dos componentes celulares e surgem danos perenes nesses tecidos (Chen et al., 2007; Sperling et al., 2008). Este tipo de terapia tem sido dirigida a tecidos tumorais, onde há pouca vascularização e conseqüentemente pouco fluxo sanguíneo para dissipar o calor gerado no microambiente (Huang et al., 2008). Estas propriedades foto-térmicas em nanomateriais à base de ouro também permitem controlar a libertação de fármacos (Vallhov et al., 2006).

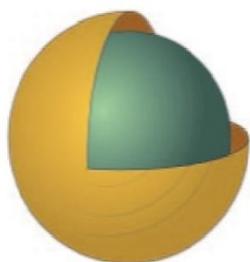


Figura 5- Ilustração de uma nanoconcha de ouro-sílica. Adaptado de McNeil, 2005.

c) Nanopartículas de sílica

A sílica (dióxido de silício) é um dos materiais inorgânicos mais promissores para a projeção de nanomateriais. As NPs à base de sílica são biocompatíveis, beneficiando de um espectro de parâmetros físico-químicos ajustáveis a fim de promover a sua interação com tecidos e células [J Am Chem Soc. 2003 Jun 18;125(24):7168-9], [Adv Drug Deliv Rev. 2008 Aug 17;60(11):1278-88], [ACS Nano. 2009 Oct 27;3(10):3273-86]. Um desses aspetos é o tamanho dos poros e a dimensão do espaço oco no interior da partícula, o que contribui para uma extensa área de superfície [Adv Drug Deliv Rev. 2008 Aug 17;60(11):1278-88], benéfica para o aprisionamento de uma elevada concentração de moléculas a transportar [Biomaterials. 2004 Feb;25(4):723-7]. As NPs à base de sílica



foram associadas ao transporte de antigénios [ACS Appl Mater Interfaces. 2012 Jan;4(1):235-43], [Virol J. 2012 Jun 12;9:108], de ácidos nucleicos [ACS Nano. 2009 Oct 27;3(10):3273-86] e de fármacos [Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells].

1.2.3.2. Atividade anti-microbiana das Nanopartículas inorgânicas

Vários tipos de NPs coloidais são capazes de exercer atividade bactericida [Trends Biotechnol. 2012 Oct;30(10):499-511], tais como NPs magnéticas [J Microbiol Methods. 2011 Jan;84(1):41-5], NPs metálicas [Environ Sci Technol. 2009 Oct 1;43(19):7285-90] ou outras formas de NPs inorgânicas, como as NPs de sílica [Biomaterials. 2009 May;30(14):2782-9]. Os mecanismos de ação incidem principalmente na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que atuam sobre os ácidos nucleicos, lípidos e proteínas essenciais à sobrevivência das bactérias [Appl Environ Microbiol. 2008 Feb; 74(4): 977–986.], [Langmuir. 2010 Mar 16;26(6):4429-36]. Estas substâncias poderão funcionar como alternativas a antibióticos no combate a bactérias multirresistentes [ACS Nano. 2014 Oct 28; 8(10): 10682–10686].

Recentemente, associaram-se propriedades anti-virais a certos tipos de NPs coloidais [Langmuir, 2012, 28 (20), pp 7646–7656], [J Nanobiotechnology. 2011 Aug 3;9:30], o que poderá abrir caminho ao desenvolvimento de novos métodos de terapia e prevenção de infeções [J Nanobiotechnology. 2010; 8: 15]. Embora não haja consenso na explicação destas propriedades, avança-se que as NPs desvirtuam lípidos membranares e proteínas responsáveis pela infeção [J Nanobiotechnology. 2005 Jun 29;3:6.], [DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2009. 17(2):88-93.].

Embora estas propriedades anti-microorganismos se devam aos materiais *per se*, pois também são encontradas quando estes materiais estão num estado *bulk*, as nanoestruturas são descritas como sendo mais eficientes na promoção de condições assépticas [Bioresour Technol. 2011 Jan;102(2):1516-20], [J Nanobiotechnology. 2011 Aug 3;9:30].

1.2.3.3. Toxicidade associada às Nanopartículas inorgânicas

Apesar dos nanomateriais serem muitas vezes anunciados como biocompatíveis, não-imunogénicos e não-tóxicos, não se pode descuidar os potenciais efeitos nefastos na saúde e no ambiente, pelo que os produtos da nanotecnologia devem ser avaliados nesta vertente de forma rigorosa, em especial quando o destinatário é o ser humano [Small. 2008 Jan;4(1):26-49]. Para além do mais, ainda que a informação relacionada com a toxicidade de vários materiais inorgânicos, no seu estado macroscópico, esteja bem documentada [Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 583–591], os perigos a longo prazo dos nanomateriais são frequentemente distintos [Mol Pharm. 2011 Dec 5;8(6):2101-41]. Tomando como exemplo, as NPs de ferro são descritas como “biocompatíveis” por o ferro estruturante ser metabolizado e incorporado na



homeostasia do organismo [Radiology. 2003 Dec;229(3):838-46]. No entanto, muitos autores descrevem estudos em que as NPs de ferro apresentam elevados índices de toxicidade celular [Int J Nanomedicine. 2010; 5: 983–989], [Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Jun 1;245(2):272-9].

1.2.4 Partículas derivadas de vírus

1.2.4.1 Vírus como transportadores de moléculas biologicamente ativas

Os vetores virais consistem em vírus geneticamente modificados por forma a limitar ao máximo a sua capacidade de replicação e de infeção do hospedeiro [Adv Drug Deliv Rev. 2008 May 22;60(8):915-28]. O seu genoma foi modificado com material genético que seja de interesse transportar, i. e., genes que codifiquem proteínas que terão uma ação terapêutica [Gene Ther. 2000 Oct;7(20):1744-52] ou preventiva [J Virol. 2001 Dec; 75(23): 11474–11482], [Vaccine. 2005 Jan 11;23(8):1029-36], ou genes que alterem o conteúdo genético das células-alvo [Lancet. 2007 Jun 23;369(9579):2097-105]. Exemplos de vírus que já mostraram alguma taxa de sucesso em estudos clínicos e pré-clínicos incluem adenovírus [Vaccine. 2005 Jan 11;23(8):1029-36] e o vírus da Varíola do canário [J Infect Dis. 2001 Apr 15;183(8):1171-9].

As elevadas taxas de transfeção dos vetores virais assentam na capacidade inata dos vírus invadirem células e promoverem a expressão do seu material genético (Mansouri et al., 2004). No entanto, são consensuais as desvantagens apresentadas em relação a outros tipos de vetores: vetores virais podem causar mutagêneses e respostas imunitárias específicas e/ou inespecíficas (Jayakumar et al., 2010; Yin et al., 2014), além de terem um limite baixo em termos da quantidade de material genético que podem transportar (Nayerossadat, Maedeh, & Ali, 2012). Por terem tropismos naturais para certos tecidos e células, apresentam reduzida direcionalização para as células-alvo pretendidas e especificidade da entrega (Jayakumar et al., 2010), o que não vai de encontro aos objetivos terapêuticos com que são transformados (Rollier et al., 2011; Waehler et al., 2007). Além disso, a produção é teoricamente mais dispendiosa (Khalil et al., 2006) pois as orientações internacionais exigem instalações com níveis de segurança biológica (NSB) no mínimo de 2, como é exemplificado pela legislação em vigor nos Estados Unidos da América (Chosewood, Wilson, Centers for Disease, Prevention, & Health, 2009). Especula-se que os vetores virais têm ainda de enfrentar uma maior atividade das células do sistema imunitário comparativamente a outras formas de transportadores, devido aos anticorpos que se formam após o primeiro contacto com o vírus (seja este por infeção natural ou por tratamento clínico) e que tendem a dificultar administrações posteriores (Peters et al., 2013; Thomas et al., 2003); se bem que Halbert e colaboradores (2000) propuseram a combinação de diferentes serotipos do mesmo vírus parental como maneira de obter vírus menos imunogénicos.



Uma das maiores limitações dos vetores virais é não conseguirem transportar outras moléculas bioativas, de origem sintética (como péptidos e outros compostos orgânicos ou inorgânicos), para além do material genético (Pichon et al., 2010), contrariando a versatilidade associada aos vetores não-virais. Recentemente, houve tentativas de acoplar NPs de ouro [Nano Lett. 2006 Apr;6(4):587-91] ou de óxido de ferro [Hybrid Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging of Target-Specific Viral Gene Delivery] a vetores virais para induzir hipertermia de tumores ou formular agentes de imagem, respetivamente. Também há o objetivo de ultrapassar os tropismos naturais que os vetores virais apresentam e que impedem que sejam direcionados para outras células; [Mol Ther. 2004 May;9(5):712-20] exploraram os efeitos de se adicionar à superfície de adenovírus um ligando específico para o recetor CD40 das células dendríticas (DC) a fim de aumentar a eficácia de transfeção nestas células.

1.2.4.2. Partículas tipo vírus

As partículas tipo vírus (VLPs) são complexos proteicos artificiais inspirados em vírus [Vaccine. 2014 Jan 9;32(3):327-37]. Relativamente a vetores virais e vírus inalterados, as VLPs apresentam menos riscos de virulência, pois não só não contêm o material genético viral (do mesmo modo que os vetores virais), como também são estruturas à base de proteínas produzidas por tecnologia de DNA recombinante e purificadas de outros componentes virais [Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2011 Mar-Apr;3(2):174-96]. Apesar disto, não deixam de ter carácter antigénico semelhante aos vírus parentais, pois mimetizam-nos na forma e estrutura: as VLPs servem-se da tendência natural que proteínas, derivadas dos envelopes ou dos capsídeos dos vírus, têm em aglomerar-se e reconstituir esses componentes para ativar o sistema imunitário (útil se objetivo é a vacinação, caso contrário poderá constituir um *handicap*) [Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2011 Mar-Apr;3(2):174-96], [Nat Rev Drug Discov. 2011 Jul 1;10(7):521-35].

Em comparação com os vetores virais, a produção de VLPs é um processo simples e não muito dispendioso [Nat Rev Drug Discov. 2011 Jul 1;10(7):521-35]. Estas partículas também possuem tropismos naturais, mas podem ser facilmente funcionalizadas com anticorpos ou péptidos para uma entrega seletiva [Bioconjug Chem. 2005 Nov-Dec;16(6):1572-9]. E é aí que reside uma das mais-valias das VLPs: podem transportar vários tipos de moléculas biologicamente ativas de origem exógena, nomeadamente proteínas [J Allergy Clin Immunol. 2006 Jun;117(6):1470-6] ou agentes de contraste [J Am Chem Soc. 2008 Feb 27;130(8):2546-52].

As VLPs foram as primeiras partículas nano a chegar ao mercado das vacinas, com o objetivo de imunizar contra o vírus da Hepatite B [Vaccine. 1990 Mar;8 Suppl:S74-8; discussion S79-80], seguindo-se novas gerações cada vez mais eficientes [Vaccine. 2001



Oct 12;20(1-2):92-7]. Simultaneamente, esta foi também a primeira vacina recombinante [Vaccine. 2014 Jan 9;32(3):327-37]. Outra vacina VLP já disponível comercialmente é a vacina contra o vírus do papiloma humano [MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010 May 28;59(20):626-9] usada na prevenção de várias formas de cancro, sendo de destacar o cancro do colo do útero [Clin Dermatol. 2014 Mar-Apr;32(2):227-34].

1.3 Nanopartículas e as vantagens da sua aplicação em vacinas

De entre as diversas aplicações da nanomedicina, a área da prevenção, nomeadamente o desenvolvimento de novas vacinas ou de novas formulações de vacinas tem experimentado um grande interesse por parte da comunidade científica. As nanopartículas desenhadas com o propósito de terem uma função de adjuvante em vacinas vêm revolucionar um campo da saúde pública de grande importância para a humanidade, a par de melhorias na alimentação ou de novas práticas de higiene (Greenwood, 2014; Rappuoli et al., 2014).

As primeiras vacinas (e ainda hoje se aplica este princípio) baseavam-se num princípio de exposição de cada indivíduo a microrganismos infecciosos mortos, ou vivos mas atenuados (Rappuoli et al., 2014), para prevenção de um largo grupo de doenças, pois promovia-se em cada pessoa vacinada, respostas imunitárias adaptativas e específicas para um antigénio e imunidade de longo-termo ante posteriores encontros com o mesmo antigénio (Silva et al., 2016). O resultado foi a erradicação de infeções com grandes taxas de propagação nas populações e mortalidade, tais como poliomielite, varíola e até sarampo (Borges et al., 2010; Manmohan, 2013).

No entanto, a aplicação de vacinas não surtiu efeitos em doenças crónico-infecciosas, como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou tuberculose, nem em doenças não-infecciosas, como a maioria das múltiplas formas de cancro e doenças neuro-degenerativas, sendo que, estas últimas, estão a tornar-se nas principais causas de mortalidade a nível mundial (Rappuoli et al., 2014). Isto abriu espaço para o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias na pesquisa de vacinas, entre as quais tecnologia de DNA recombinante (notabiliza-se o desenvolvimento de uma vacina contra a hepatite B, descrito por Stevens et al. (1987)), ou formulação de vacinas conjugadas (conjugação de antigénios proteicos a partes da cápsula bacteriana para indução de respostas imunitárias em crianças, como é modelo a vacina contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Black et al., 1988)), promovendo uma investigação mais racional.

No início do século passado iniciou-se um desenvolvimento de vacinas mais racional e menos empírico (Rappuoli et al., 2011, ~~Rappuoli et al.~~, 2014), como são modelo as vacinas de sub-unidade, arquitetadas para fazer face aos perigos de muitos microrganismos infecciosos [Adv Drug Deliv Rev. 2008 May 22;60(8):915-28]. Esta política de vacinar indivíduos, com vacinas de composição mais simples é prática atual, como é exemplo a vacina recombinante contra o vírus da Hepatite B (JAMA. 1987 May



15;257(19):2612-6). Mas estas proteínas recombinantes são geralmente muito pouco imunogénicas, pois perderam muitas das moléculas imunoestimuladoras presentes no patogénio original [Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2011 Mar-Apr;3(2):174-96].

A solução para conseguir obter vacinas igualmente eficazes, quando comparadas com a vacinas constituídas pelo microrganismo inteiro (inativado ou vivo atenuado), passa pelo uso de adjuvantes, i. e., substâncias que potenciam a resposta imunitária contra determinado antigénio, como moléculas imunoestimuladoras, ou sistemas de entrega [Hum Vaccin Immunother. 2016 Apr 2;12(4):1056-69]. As NPs poderão ser um trunfo no desenvolvimento de novas vacinas: por um lado, poderão elas mesmas ser imunogénicas (vetores virais e VLPs) e modular a resposta imunitária que o organismo dá quando é confrontado com o antigénio; por outro lado, poderão co-transportar moléculas que ativam o sistema imunitário inato e entregá-las a células-alvo [Nanomedicine (Lond). 2014 Dec;9(17):2657-69].

Como as nanopartículas têm de interagir com as células do sistema imunitário para gerar uma resposta imunitária, i. e., têm de ser reconhecidas, internalizadas, processadas e apresentadas pelas células apresentadoras de antigénio (APCs) a outras células efectoras, torna-se imperativo conhecer com pormenor estes processos, quer para diminuir a toxicidade do material particulado (NPs) e do que lhe está associado, quer para obter um processo de vacinação mais eficiente e eficaz [Hum Vaccin Immunother. 2016 Apr 2;12(4):1056-69]. Por conseguinte, o 2º capítulo desta monografia é dedicado às diferentes formas das células imunitárias internalizarem as NPs. O 3º capítulo relata o mecanismo de *cross-presentation*, uma via alternativa das APCs apresentarem antigénio aos linfócitos T CD8+ e assim promoverem imunidade celular, um dos pontos em que as vacinas atualmente disponíveis falham e que permitirá progressos face a doenças cancerígenas ou doenças que resultem de infeções por patógenos endógenos, como malária ou SIDA [Int J Pharm. 2013 Jan 2;440(1):27-38]. Esta via da *cross-presentation*, para que seja explorada e se tire partido dela do ponto de vista clínico, requer que o material particulado seja internalizado por apenas alguns mecanismos de endocitose, o que evidencia a importância de estudar as vias endocíticas.



2. Internalização de nanopartículas em células

As células, como sistemas abertos, trocam materiais com o exterior, desde partículas de tamanho reduzido (como iões) até macromoléculas também importantes a nível biológico. As membranas (tanto a celular como as presentes em organelos) compartimentam meios contendo diferentes moléculas a diferentes concentrações, consonante com a química exigida (Doherty & McMahon, 2009; Monnard & Deamer, 2002). Essa compartimentação é chave para manter a integridade celular (Monnard & Deamer, 2002), pois processos bioquímicos de outra forma inconciliáveis podem ocorrer na mesma célula (Canton & Battaglia, 2012).

Tal como outros materiais, as NPs são internalizadas nas células eucariotas através de mecanismos complexos que necessitam da intervenção de lípidos e/ou proteínas (Panariti et al., 2012). Uma internalização ideal garante não só eficiência no processo em que a NPs intervém e na sua direcionalização para células-alvo (Oh & Park, 2014), como também menor toxicidade e efeitos secundários (Hillaireau & Couvreur, 2009) ao serem minimizados os contactos com células/tecidos/órgãos que não são o alvo pretendido (Khalil et al., 2006). O conhecimento exato das vias de internalização celulares é fundamental para a formulação de partículas mais seguras e mais eficientes na sua aplicação biomédica (Hillaireau & Couvreur, 2009; Khalil et al., 2006). Essas vias de internalização dividem-se em transporte passivo e transporte ativo.

2.1 Tipos de vias de internalização de nanopartículas

Transporte passivo compreende vários mecanismos de internalização, como difusão simples ou difusão facilitada, que permitem o transporte de pequenas moléculas tendo em conta um gradiente de concentrações, sem conduzir a gastos de energia para as células (Panariti et al., 2012; Roger et al., 2010). Ao nível da difusão simples através de membranas celulares, há uma aparente tendência das moléculas assim internalizadas terem um certo carácter hidrofóbico (Roger et al., 2010). Partículas solúveis em água apenas conseguem penetrar a membrana na presença de transportadores membranares ou canais responsáveis pelo seu transporte (difusão facilitada) (Szachowicz-Petelska et al, 2001). Apesar das nanopartículas não poderem, em teoria, penetrar barreiras membranares devido ao seu tamanho (não deixam de ser estruturas supra-moleculares), pode acontecer que libertem os compostos que transportam ao interagir com as membranas e que estes entrem por difusão passiva por serem mais pequenas (Roger et al., 2010). As células mais utilizadas como modelo para estudo de difusão passiva de partículas são os glóbulos vermelhos, por não possuírem maquinaria endocítica (Treuel et al., 2013).

O transporte ativo (Figura 6), no qual estão envolvidos gastos de energia celular, é também denominado de endocitose e tradicionalmente dividido em fagocitose e pinocitose (Canton & Battaglia, 2012); neste último há, além dos solutos, a entrada de fluidos extracelulares. A função da endocitose, mecanismo indissociável da exocitose (via que permite saída de material do interior das células para o meio exterior) na



promoção da homeostasia celular (Canton & Battaglia, 2012), não se resume à entrada de nutrientes mas também às vias de sinalização celular ou até à apresentação de antígeno (Canton & Battaglia, 2012; Doherty & McMahon, 2009). A endocitose é a principal via explorada por vírus e bactérias para entrar nas células (Canton & Battaglia, 2012), pelo que o sistema imunitário evoluiu por forma a detetar e reconhecer estes patógenos baseado no seu tamanho, forma ou composição química (Underhill & Goodridge, 2012; Xiang et al., 2006). Posteriormente, as células produzem uma resposta imunitária apropriada a estas características detetadas (Underhill & Goodridge, 2012). Esta estratégia pode ser mimetizada, usando, por exemplo, nanotransportadores com tamanhos próximos de vírus ou bactérias com intuito de desenhar vacinas eficazes (Fifis et al., 2004; Xiang et al., 2006).

As vias pinocíticas são constituídas por macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose dependente de clatrina e de caveolina (Hillaireau & Couvreur, 2009).

Uma partícula experimenta determinado tipo de transporte dependendo do seu tamanho (e de outras características, como a forma, as espécies químicas de superfície ou a carga), mas a sua forma de internalização não está dependente de uma única via (Dobrovolskaia et al., 2013; Franca et al., 2011; Hillaireau & Couvreur, 2009).

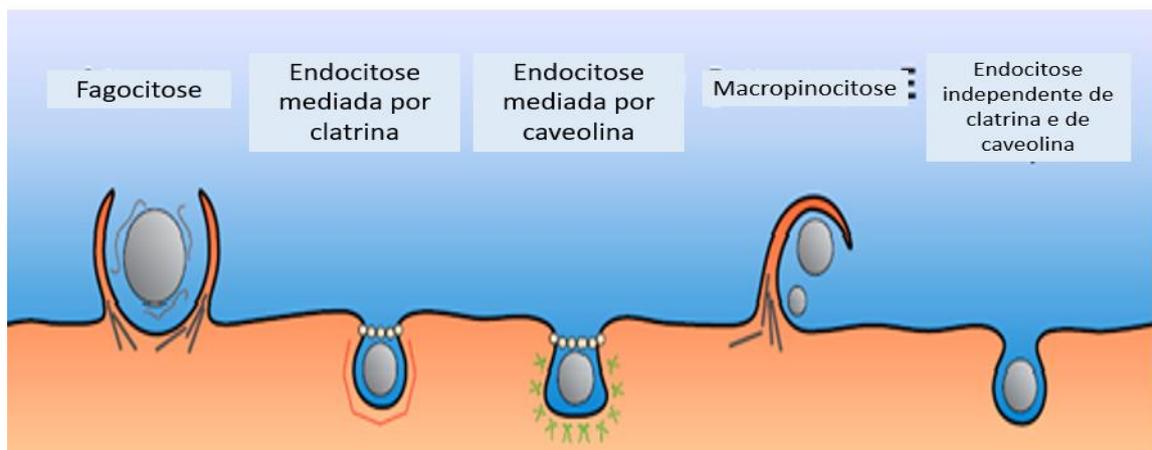


Figura 6- Transporte ativo de material em células. Adaptado de Hillaireau & Couvreur, 2009.

2.2 Vias fagocíticas

A fagocitose é importante no papel de defesa do organismo contra agentes externos infecciosos e partículas externas inertes, como as nanopartículas. Também tem uma função na limpeza de células em apoptose, a que se podem seguir importantes eventos que conduzam à tolerância de certos antígenos por parte do sistema imunitário (Trombetta & Mellman, 2005). A fagocitose ocorre preferencialmente em células especializadas para tal (fagócitos profissionais), como macrófagos, monócitos e células



dendríticas (Duncan & Richardson, 2012; Trombetta & Mellman, 2005; Zhao et al., 2011). Também pode ocorrer numa segunda linha de células, como nas células endoteliais e epiteliais, mas numa extensão muito menor (Hillaireau & Couvreur, 2009; Xiang et al., 2006).

A fagocitose pode ser descrita como o reconhecimento das partículas pelas opsoninas, ligação destas às partículas e internalização por parte das células, i. e. fagocitose mediada por recetor (Figura 7). Opsoninas são proteínas que tornam as NPs externas visíveis para as células fagocíticas. Entre os exemplos destas proteínas, destacam-se as proteínas do complemento e as imunoglobulinas. Após ligação às partículas, as opsoninas são reconhecidas pelos recetores celulares e as partículas são internalizadas com recurso a microfilamentos de actina, formando a estrutura intracelular fagossoma, com a actina em redor destes. Observa-se a fusão do fagossoma com endossomas e, por último, com lisossomas, formando-se o fagolisossoma.

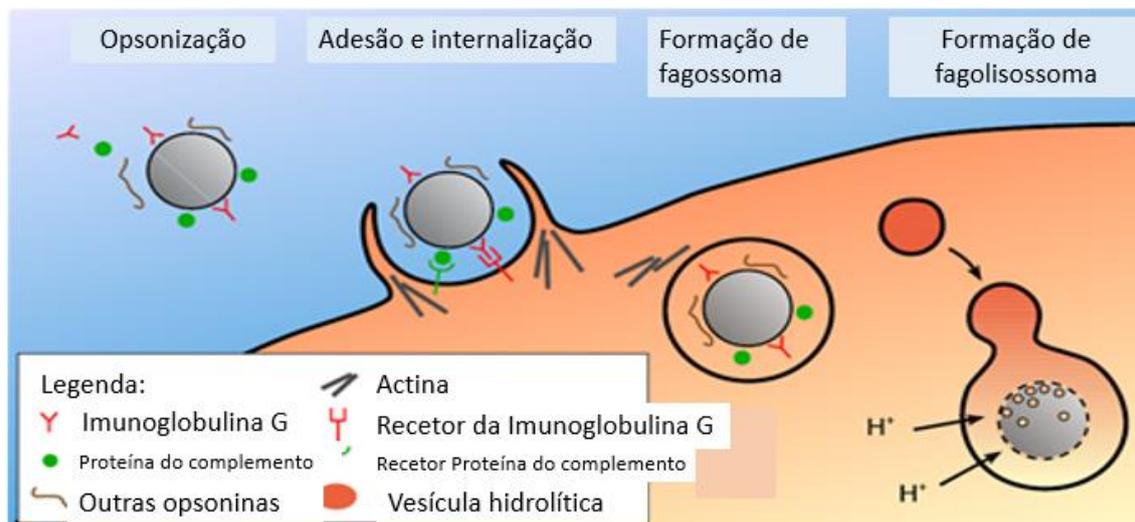


Figura 7- Representação da Fagocitose de material exógeno. Adaptado de Hillaireau & Couvreur, 2009.

Para que a internalização de material seja mais eficiente, as partículas devem ter um tamanho entre 250 nm a 3000 nm (Hillaireau & Couvreur, 2009). No entanto, recentemente refutou-se a crença que apenas partículas de tamanho superior a 500 nm são susceptíveis de serem fagocitadas (Dobrovolskaia et al., 2013), o que sugere que outras características físico-químicas das partículas (como química de superfície) têm relevo na eficácia da internalização (Hillaireau & Couvreur, 2009).

NPs carregadas (quer negativa, quer positivamente) são mais facilmente reconhecidas pelas opsoninas, e assim fagocitadas (Dobrovolskaia et al., 2013; Hillaireau & Couvreur, 2009).

Quanto à internalização por fagocitose dependente da forma, parece não haver consenso; pensa-se que esta fagocitose está dependente da forma e do local da partícula onde a opsonina se liga; p. ex., num nanomaterial côncavo, os locais mais



esféricos são mais propensos ao reconhecimento (Hillaireau & Couvreur, 2009). Assim, partículas muito achatadas como nano-bastões de ouro ou nanotubos de carbono têm tendência a permanecer mais tempo em circulação livres da internalização por fagocitose, por serem mais dificilmente reconhecidas por opsoninas que partículas esféricas (Arami et al., 2015).

Em termos de rigidez, as células fagocíticas preferem partículas mais rígidas (Panariti et al., 2012).

2.3 Vias pinocíticas

2.3.1 Macropinocitose

A macropinocitose, ao contrário da fagocitose, é praticada por qualquer célula. Consiste numa protusão de membrana guiada por actina (Figura 3), que envolve as NPs, formando-se macropinosomas. Estes internalizam partículas entre 1 μm a 5 μm . O macropinosoma acaba por se fundir com lisossomas, acidificando. Esta via ocorre para internalização de NPs de grandes dimensões e, para algumas NPs de carga positiva (Hillaireau & Couvreur, 2009; Panariti et al., 2012; Panyam & Labhasetwar, 2003). DCs usam esta forma de endocitose para vistoriar continuamente o fluido extracelular em busca de antígenos ou *danger signals* que possam iniciar uma resposta imunitária (Benne et al., 2016).

2.3.2 Endocitose mediada por clatrina

No que diz respeito à endocitose mediada por clatrina (uma proteína citosólica de 3 segmentos), esta pode ser dependente de recetor (NPs possuem ligandos para os quais as células têm recetores) – ou independente (NPs têm interações hidrofóbicas com a membrana) (Hillaireau & Couvreur, 2009). A internalização (Figura 8) inicia-se com a interação da partícula com a membrana (ou com o seu recetor), invaginação dessa região por acumulação de clatrina, cisão (em relação à membrana) da vesícula formada devido à ação das GTP-ases dinaminas, formação de um endossoma inicial por desprendimento da clatrina, o qual acidifica e funde com vesículas pré-lisossómicas que contêm enzimas, formando assim um endossoma maduro e, por fim, um lisossoma, onde é provável a degradação do fármaco transportado e do transportador. Quanto aos recetores internalizados, explorados pelos ligandos presentes na superfície das partículas, são reciclados quando a vesícula passa a um endossoma inicial, retomando o seu local de origem (Canton & Battaglia, 2012). Este passo de reciclagem é ubíquo a todas as vias endocíticas (Canton & Battaglia, 2012; Hillaireau & Couvreur, 2009).

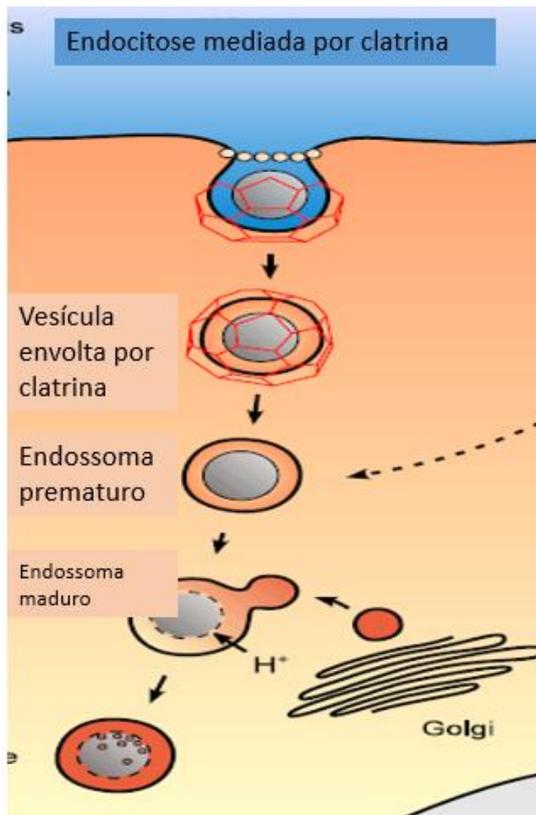


Figura 8- Ilustração da endocitose mediada por clatrina. Adaptado de Hillaireau & Couvreur, 2009.

Há algumas formas das nanopartículas escaparem à degradação que se processa nos lisossomas, através do efeito “esponja” de protões, no qual, devido ao baixo pH nas estruturas, os grupos nucleofílicos de maior pKa (ex. aminas) ficam protonados, requerendo o influxo de mais protões à ATP-ase e a entrada de um anião Cl^- (contra-íão) e de uma molécula de água por protão internalizado (Nel et al., 2009). Ocorre então a ruptura da membrana dos lisossomas, quer pelo aumento do volume de água no organelo ou por as crescentes protonações provocarem repulsões electrostáticas entre partículas de igual carga e o subsequente inchaço do polímero agir sobre a membrana (Hillaireau & Couvreur, 2009; Hu et al., 2007; Richard et al., 2013). Exemplo disto é o que se postula que ocorra com a internalização de nanopartículas de quitosano ou polímeros contendo PEI (*Polyethylenimine*) ou outros polímeros catiónicos. No entanto, não há uma alteração real do valor do pH, já que a ATP-ase vacuolar compensará este efeito com o aumento do influxo de protões (Benjaminsen et al., 2013). Atendendo a que diferentes células do sistema imunitário (neutrófilos, macrófagos ou células dendríticas) apresentam níveis de recrutamento de bombas de protões para estruturas fagocíticas bastante diferentes (Savina & Amigorena, 2007), espera-se que a extensão do efeito esponja varie consoante a célula-alvo.

No entanto, apesar da carga das partículas internalizadas ser entregue no citosol, a saída do conteúdo intra-lisossomal, como enzimas e Ca^{2+} , pode ativar mecanismos celulares apoptóticos (Nel et al., 2009).



A endocitose mediada por clatrina ocorre regularmente para algumas NPs carregadas negativamente, e para NPs a que proteínas costumam adsorver, como as NPs de ouro (Panariti et al., 2012; F. Zhao et al., 2011).

Para NPs de PLGA, (Hillaireau & Couvreur, 2009) observaram que quanto mais próximo de 100 nm fosse o tamanho das partículas, maior seria a sua internalização por endocitose mediada por clatrina (Hillaireau & Couvreur, 2009).

Se há algo que é comum em todas estas vias de internalização é que não se pode relacionar o tipo de NP e a forma de internalização que ocorre, pois há sempre que considerar as interferências do tamanho, da química de superfície, da carga e da forma (Hillaireau & Couvreur, 2009).

2.3.3 Endocitose mediada por caveolina

A endocitose mediada por caveolina consiste na formação de invaginações membranares em forma de frasco rodeadas da proteína dimérica caveolina e enriquecidas com colesterol e esfingolipídios (Hillaireau & Couvreur, 2009). Este tipo de endocitose é muito comum nas células endoteliais, nas células do músculo liso e nos fibroblastos.

O caveossoma, estrutura resultante da cisão da vesícula contendo a partícula internalizada por esta forma de endocitose, não contém vesículas hidrolíticas nem pH ácido; por isso, esta pode ser uma via preferencial para a entrega de fármacos (muitos patogénios usam esta via para escapar à degradação do lisossoma).

2.3.4 Endocitose independente de clatrina e de caveolina

2.3.4.1 *Lipid rafts*

Outras vias de internalização, independentes de clatrina e de caveolina, envolvem microdomínios presentes nas membranas ricos em colesterol e esfingolípídeos chamados de *rafts* (jangadas) (Hillaireau & Couvreur, 2009; Lucas, 2001; Roger et al., 2010). Neste tipo de internalização a célula pode recorrer a caveossomas sem a participação de caveolinas (Hillaireau & Couvreur, 2009).

2.4 Endocitose de Nanopartículas em células do sistema imunitário

Macrófagos e DCs, tidas como APCs, são capazes de proceder a uma eficaz endocitose de material não apenas por fagocitose (estas células são consideradas fagócitos profissionais), mas também por vias pinocíticas, como endocitose mediada por clatrina ou macropinocitose (Garrett et al., 2000; Mercer & Greber, 2013; Xiang et al., 2006). As células dendríticas, ao maturarem, passam de células com grande capacidade de internalizar e armazenar antigénio a células com menos potencial de internalização/endocitose, mas cujas principais funções são a degradação e a



apresentação de antígeno a linfócitos T (Garrett et al., 2000; Mellman & Steinman, 2001).

Em relação a estudos envolvendo a internalização de partículas de pequenas dimensões, na ordem de nanómetros ou micrómetros, por macrófagos ou DCs, (Lunov et al., 2011) estudaram (*in vitro*) os mecanismos de endocitose de nanopartículas de poliestireno (diâmetro médio de 110 nm) em macrófagos humanos. Em meio contendo soro humano de doadores de grupo sanguíneo AB (que possui proteínas plasmáticas como imunoglobulinas (“não necessariamente contra antígenos do sistema AB”) ou albumina (Whiteaker et al., 2007)), os macrófagos internalizaram as partículas de poliestireno primariamente por fagocitose ligada ao recetor CD64, um receptor de Imunoglobulina G (IgG) associado a este tipo de endocitose (Nimmerjahn & Ravetch, 2007, 2008). A simples adição de proteínas plasmáticas, capazes de promover opsonização das nanopartículas (Nel et al., 2009; Owens & Peppas, 2006), ao meio salino “HBSS” desprovido de proteínas, revelou-se suficiente para que a fagocitose (associada ao receptor CD64) suplantasse o peso de outras vias endocíticas na internalização das nanopartículas envolvidas no estudo, isto quando a via fagocítica, tanto para partículas carregadas negativa ou positivamente, representava uma relevância irrisória na presença de meio salino face a endocitose mediada por clatrina e endocitose dependente de dinamina para NP-COOH e macropinocitose para NP-NH₂ (dados aferidos por uso de inibidores endocíticos).

Num estudo envolvendo a internalização de *Quantum-Dots* (QD) em DCs de suíno diferenciadas de monócitos do sangue periférico (Zhang et al., 2011), observou-se que apenas QD funcionalizados com ácidos carboxílicos (carga de superfície negativa) foram extensivamente internalizados por monócitos e DCs, ao contrário de QD com PEG (carga de superfície neutra) ou PEG-NH₂ (carga de superfície positiva), o que levou os autores a prosseguirem os seus estudos relativos aos mecanismos de endocitose com QD de carga de superfície negativa. Como descrito em outras publicações (Cruz et al., 2011), a funcionalização dos QD com PEG poderá ter ocultado estas partículas às DCs, células que promovem fagocitose.

Os mecanismos com maior responsabilidade na internalização de QD-COOH foram endocitose mediada por clatrina e macropinocitose. Estimou-se que recetores *scavenger* podem reconhecer os QD em estudo. Estas observações mantiveram-se mesmo após a maturação das células dendríticas com LPS, o que contraria uma visão clássica de que a maturação das células dendríticas provoca uma diminuição ou até uma cessação da capacidade de promover endocitose (Garrett et al., 2000; Platt et al., 2010; Trombetta & Mellman, 2005), e vem no seguimento de observações de que a maturação das células dendríticas interfere apenas nas vias macropinocíticas e fagocíticas não-dependentes de recetor (por diminuição dos níveis endógenos da GTP-ase Cdc42 na forma fosforilada ativa (Garrett et al., 2000), enquanto que vias de internalização mediada por recetor se mantêm ativas (Platt et al., 2010). Já se sabia através dos estudos de Garrett et al., (2000) que a quantidade de clatrina membranar presente em vesículas não diminuía com a maturação das células dendríticas.



2.5 Formas de alterar a eficácia da internalização

Existe resistência das células à internalização das NPs, por vezes motivada pela biofísica dos lípidos da membrana. Existe a possibilidade de as membranas poderem ser mais rígidas por conter determinado tipo de lípidos (colesterol; fornece maior rigidez) em maior quantidade, o que diminui a permeabilidade membranar (Peetla et al., 2013). Para ultrapassar esta resistência celular, várias estratégias podem ser empregues. Uma delas é a direcionalização da entrega, que se espera possibilitar a diminuição da quantidade de fármaco necessária (Pichon et al., 2010). Explorando a diversidade de recetores (p. ex. transferrina, ácido fólico, manose) presentes na superfície das células, a internalização pode ser incrementada combinando ligandos destes recetores com as NPs (Hillaireau & Couvreur, 2009; Pichon et al., 2010).

Outra estratégia que tem sido seguida por alguns grupos de investigação é a ligação de péptidos com capacidade de penetrar a membrana celular (*Cell Penetrating Peptides*) às NPs. Um exemplo é o peptídeo ativador de transcrição-trans (peptídeo TAT) que, tal como os peptídios da família, é hidrofóbico e/ou carregado positivamente (Vives, 2003). Em estudos com linhas celulares tumorais da glândula mamária, nanopartículas de sílica conjugadas com o peptídeo TAT conseguiram ultrapassar a resistência celular já que esta associação permitiu aumentar a interação das nanopartículas com os lípidos membranares (Peetla et al., 2013).

Além desta associação com um peptídeo, podem ainda usar-se NPs carregadas positivamente. A carga positiva parece facilitar a internalização já que ocorre maior interação com as cargas negativas das cabeças dos fosfolípidos da membrana (Peetla et al., 2013). No entanto, e de encontro com o anteriormente discutido, NPs de carga negativa também conseguem ser eficientemente internalizadas pelas células, através da interação com glicoproteínas da membrana carregadas positivamente (Zaki et al., 2011).

Várias formulações particuladas podem ser revestidas por PEG, estratégia inicialmente aplicada em algumas proteínas, conferindo às NPs um carácter anfifílico. Estas NPs modificadas têm a capacidade de escapar às opsoninas do sistema imunitário e ao ataque de proteases e de nucleases, permanecendo mais tempo em fluidos biológicos como o sangue (Nel et al., 2009), garantindo a prorrogação do tempo de semi-vida do fármaco e, conseqüentemente, administrações mais espaçadas (Veronese & Pasut, 2005). A literatura científica é rica em exemplos de NPs que tiram proveito da funcionalização com PEG para persistirem no organismo, como NPs de ouro [Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Apr 1;236(1):16-24], lipossomas [Int J Pharm. 2006 Apr 7;312(1-2):83-9], ou adenovírus [Biotechnol Bioeng. 2005 Oct 5;92(1):24-34]

Outra forma de tentar ir de encontro a uma internalização de nanomateriais mais bem-sucedida por parte das células é escolher a via de administração no organismo à qual não estejam associadas barreiras fisiológicas que se querem evitar. Vacinas administradas por via subcutânea ou intradérmica podem ser vantajosas comparativamente a vacinas administradas na vasculatura sanguínea (Dobrovolskaia et



al., 2013; Reddy et al, 2006, 2007), uma vez que no último caso as partículas geralmente passam por órgãos com funções de filtrar o sangue e promover a eliminação destas (i. e. fígado e rins), além de haver metabolismo das partículas no fígado e subseqüentes alterações físico-químicas que podem originar respostas diferentes das desejadas (Arami et al., 2015). Nestes órgãos residem células fagocíticas como DCs, monócitos e macrófagos-residentes que formam o *MPS (mononuclear phagocytic system)* juntamente com uma rede de proteínas fibrosas sintetizadas por fibroblastos aí presentes (Arami et al., 2015; Chow et al., 2011). Já partículas administradas por via subcutânea, intramuscular ou intradérmica tendem a passar primeiro por nódulos linfáticos, o que aumenta a possibilidade de, no caso de vacinas, os antígenos serem internalizados por APCs que posteriormente apresentam o antígeno aos linfócitos T, iniciando a resposta imunológica esperada. O sistema linfático como alvo da entrega de fármacos ou antígenos tem várias vantagens (Swartz, 2001): o fluxo de linfa é bastante menos célere que o de sangue, o que causa menos colisões entre partículas que possam pôr em causa a sua integridade; os nódulos linfáticos funcionam como reservas e sítios de proliferação para células do sistema imunitário que são alvos terapêuticos (Nishioka & Yoshino, 2001) e como pontos de passagem para células tumorais que pretendem criar metástases; direcionar esta entrega para nódulos linfáticos específicos ajuda a evitar efeitos secundários sistêmicos.

Os nanotransportadores podem ou não aproveitar a vasculatura do sistema linfático dependendo do seu tamanho: partículas de diâmetro inferior a 40 nm são difundidas muito mais facilmente pelo fluxo de linfa circulante até aos nódulos linfáticos (Dobrovolskaia et al., 2013; Reddy et al., 2006, 2007), pois a matriz intersticial (que circunda as células) é uma rede com uma estrutura capaz de aprisionar partículas de maiores dimensões e impedir a sua passagem para vasos linfáticos (Reddy et al., 2007; Swartz, 2001).

Como já foi referido, vários fatores impedem a formação de uma regra que permita inferir a via escolhida para internalização com base no tipo da NP em ação. Um desses fatores é o tipo de linha celular, como demonstrado nos trabalhos de Douglas et al. (2008). Dando como exemplo, sabe-se que quanto mais dependente de clatrina é a via de internalização celular de uma determinada linha celular, maior a eficácia da transfeção em curso, ao contrário de vias mais dependentes de caveolina (Douglas et al. (2008).



3. Influência do mecanismo de internalização na resposta imunológica a antígenos encapsulados em nanopartículas: vias de apresentação cruzada (*cross-presentation*)

As vias que levam à permanência das NPs em lisossomas podem ser muito importantes quando à NP está acoplado um antígeno, mas não um fármaco, já que no primeiro caso pode haver uma digestão útil do antígeno e consequente apresentação a células do sistema imunitário, enquanto que o metabolismo de um fármaco pode alterar a concentração e eficácia do composto ativo (Arami et al., 2015). Neste caso, as nanopartículas são direcionadas para células APC. O termo APC refere-se mais propriamente à habilidade de qualquer célula poder usar as suas proteínas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) para apresentar peptídeos reconhecidos pelos recetores dos linfócitos T e de outros linfócitos citotóxicos (linfócitos *Natural Killer* (NK)) (Steinman & Idoyaga, 2010). As DCs, tal como os macrófagos e os linfócitos B, são células profissionais apresentadoras de antígeno já que expressam (constitutivamente ou não) proteínas MHC II, detetadas por linfócitos T CD4+ auxiliares, e ainda conseguem entregar moléculas co-estimuladoras (Owen et al., 2013). As DCs são ainda células acessórias capazes de controlar a resposta dos linfócitos T, seja esta imunológica ou tolerogénica (Steinman & Idoyaga, 2010).

A maior parte dos antígenos que fazem parte das vacinas segue esta via: após serem processados pelas APCs, os péptidos resultantes são apresentados aos linfócitos T CD4+ (que têm um papel acessório na resposta humoral). Verifica-se que, na maior parte das situações, não conseguem ser apresentadas diretamente a linfócitos T CD8+ (mediadores da imunidade celular), contrariamente ao verificado para antígenos internos (Yue et al., 2012). No entanto, a comunidade científica tem colocado a hipótese dos antígenos encapsulados em NPs, tal como vírus de origem externa, conseguirem ultrapassar isto, pois poderão ser apresentados pelas células APC a linfócitos T CD8+ (Owen et al., 2013). Esta via designa-se de apresentação cruzada de antígeno (*cross-presentation*) e surge como resposta às perguntas/ dilemas: 1) Como é que as células APC profissionais conseguem apresentar antígenos aos linfócitos T CD8+ sem terem de estar infetadas por vírus? 2) Para que qualquer célula infetada consiga ativar linfócitos T CD8+ imaturos, tem de expressar moléculas co-estimuladoras, mas essa expressão está restrita às células APC profissionais. 3) Como é que antígenos de origem externa, normalmente apresentados pela via exógena de apresentação de antígeno (que envolve endossomas e lisossomas e culmina na apresentação de peptídeos derivados do antígeno em proteínas MHC II) são apresentados pela via maioritariamente reservada a antígenos de origem interna (via endógena de apresentação de antígeno, que envolve degradação dos antígenos proteicos pelo proteassoma e culmina na apresentação em proteínas MHC I)? (Burgdorf & Kurts, 2008; Owen et al., 2013).

Em termos moleculares, o processo de *cross-presentation*, tal como os estudos e as revisões de Savina e Amigorena (Joffre et al., 2012; Segura & Amigorena, 2014) preconizam, tem duas vias possíveis, uma citosólica e outra vacuolar (Figura 9). Na via citosólica, após a entrada da partícula externa na célula e compartimentação num



endossoma, há a saída da partícula para o citosol, a sua digestão até ao grau de peptídeo com as características físico-químicas requeridas para apresentação pelas proteínas MHC I e, por (possível) participação do transportador TAP (transportador associado com o transporte de antigénio), dá-se o carregamento do peptídeo nas proteínas MHC I, seja a partir do Retículo Endoplasmático ou do endossoma (neste último, após reentrada do peptídeo neste compartimento celular).

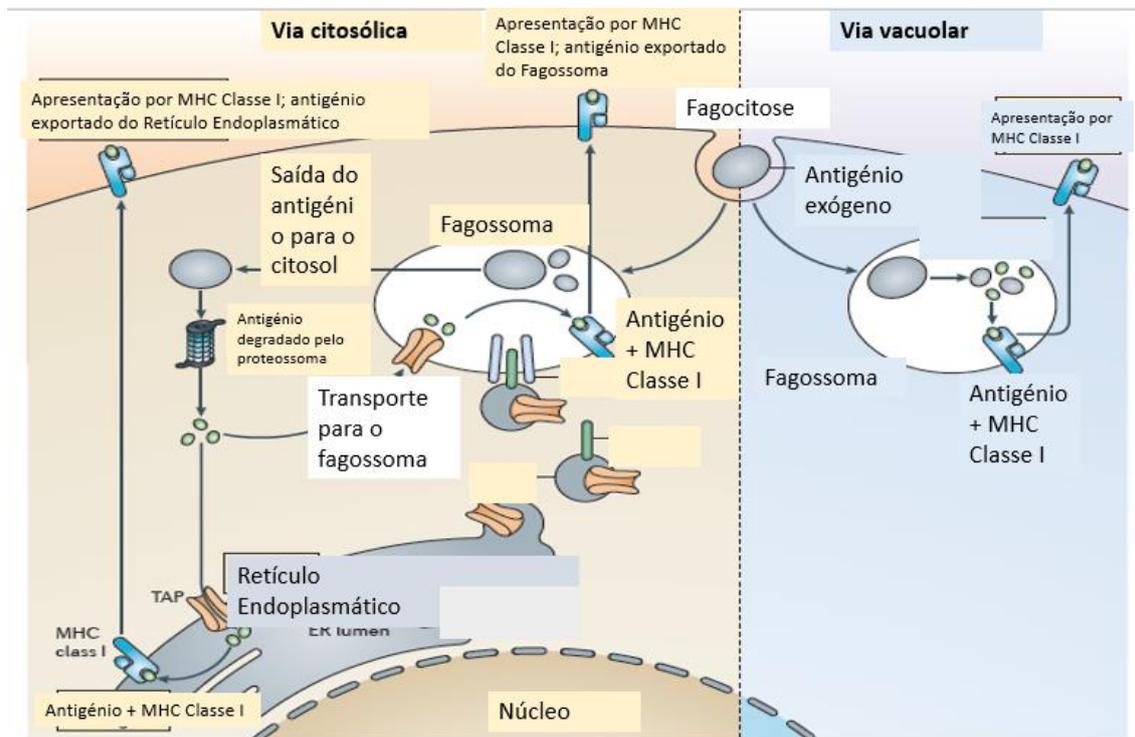


Figura 9- Vias intracelulares para *cross-presentation* (em células dendríticas). Adaptado de Joffre et al., 2012.

Na via vacuolar, tanto a digestão como o carregamento da partícula nas proteínas MHC I dão-se no endossoma em que a partícula é acumulada após internalização na célula (Figura 9).

Apesar de estudos *in vitro* evidenciarem que vários tipos de APC conseguem realizar *cross-presentation* (Segura & Amigorena, 2014), a maioria dos estudos demonstra que as células dendríticas são as principais APC a experienciar *cross-presentation in vivo* (Joffre et al., 2012; Owen et al., 2013; Segura & Amigorena, 2014). No entanto, ainda que quase todos os sub-tipos de células dendríticas sejam capazes de exercer *cross-presentation* a linfócitos T CD8+, a magnitude da resposta que as células T dão difere entre os sub-tipos (Segura & Amigorena, 2014), com as células dendríticas CD8 α + (residentes em órgãos linfáticos)/ CD103+ (migratórias, presentes em tecidos) (em rato) e as células dendríticas homólogas CD141+ (em humano), a induzirem uma resposta mais potente (Joffre et al., 2012). Esta homologia travada entre células de diferentes



espécies que permite considerar “equivalências” baseia-se em homologias a nível funcional, fenotípico e transcrito inter-espécies (Guilliams et al., 2014; Satpathy et al., 2012).

A proposta do mecanismo de *cross-presentation* como hipótese para explicar que antigénios de origem exógena induzam uma resposta citotóxica conheceu uma miríade de contra-argumentos (Kurts et al., 2010), como a hipótese de existirem antigénios que são prontamente degradados e por essa razão não conseguem ser devidamente apresentados, a hipótese das linhas tumorais usadas como modelo de APCs *in vivo* não mimetizarem por completo as funções das APCs reais, ou a possibilidade de nem todos os tipos de células dendríticas conseguirem levar a cabo *cross-presentation* (Kurts et al., 2010).

Um outro problema conceptual parecia ser se células dendríticas que internalizaram vírus ou células tumorais, ao entrarem em contacto com linfócitos T citotóxicos para apresentação de antigénio e ativação da resposta celular, seriam eliminados por estes, um princípio que punha em causa toda a estrutura e função do sistema imunitário (Kurts et al., 2010). Esta ideia foi refutada pela descoberta que os linfócitos T não precisam de uma estimulação contínua por parte das DCs para permanecerem ativados, o que não lhes daria tempo para exercer a sua atividade citotóxica contra as APCs, e que há sub-tipos de DCs que não têm a habilidade de serem intérpretes do mecanismo da *cross-presentation* (Kurts et al., 2010).

A possível influência que a via endocítica, pela qual as APCs internalizam as NPs, tem na resposta imunitária contra antigénios transportados pelas NPs é uma questão de aceso debate entre especialistas [Curr Opin Immunol. 2015 Jun;34:16-21]. A maioria dos estudos acaba por ser feito usando apenas antigénios-modelo, como OVA, solubilizados [Blood. 2012 Sep 6;120(10):2011-20], ou particulados mas associados a restos de microrganismos [J Exp Med. 2007 Nov 26;204(12):2889-97]. No entanto, parece consensual que antigénios de origem exógena geram respostas imunitárias mais vocacionadas para a produção de anticorpos se, ao serem internalizados pelas APCs, forem prontamente dirigidos para populações de endossomas maduros e lisossomas, onde são rapidamente degradados e apresentados por MHC II a linfócitos T CD4+ [Front Physiol. 2015 Jan 30;6:1]. Pelo contrário, se os antigénios forem encaminhados para populações de endossomas num estado prematuro, são degradados mais lentamente, o que advém das condições químicas que aí encontram. Desta forma, aumentam as chances de serem apresentados a linfócitos T CD8+ pelo complexo proteico MHC I, ocorrendo *cross-presentation* [Curr Opin Immunol. 2008 Feb;20(1):89-95]. Só mais tarde é que estes antigénios são encaminhados para populações de endossomas mais maduros ou para lisossomas, onde o ambiente ácido conduz a uma degradação célere e a uma apresentação por MHC II a linfócitos T CD4+ [Curr Opin Immunol. 2008 Feb;20(1):89-95].

A explicação para qual das vias segue um antigénio internalizado poderá passar pelos recetores membranares com que contacta [Curr Opin Immunol. 2008 Feb;20(1):89-95]. Desta forma, poder-se-á tirar partido da funcionalização dos antigénios com ligandos

David José Caetano Coelho



conducentes à resposta imunitária desejada [Curr Opin Immunol. 2008 Feb;20(1):89-95].



Conclusão

As NPs, estruturas particuladas na nanoescala, são constituídas por materiais de origem natural ou sintética, e a possível biocompatibilidade é profícua no desenvolvimento de aplicações na medicina, entre as quais agentes de contraste em imagiologia e *carriers* de fármacos ou antigénio.

Torna-se imperativo conhecer as interações das nanopartículas com tecidos e células, não só para evitar efeitos tóxicos do material que compõe a formulação farmacêutica como também por o perfil de resposta ao material transportado variar consoante a via de internalização celular. Relativamente a formulações particuladas que transportem antigénios, a via endocítica e os recetores associados a essa internalização influenciam a resposta imunitária obtida, o que permite uma resposta adaptativa mais humoral, celular ou até imunossupressora consoante a aplicação pretendida.

Neste trabalho de revisão pretendeu-se realçar a importância que as vias endocíticas podem adquirir na obtenção da resposta imunitária desejada a NPs com função de adjuvante; numa fase inicial, abordaram-se conceitos da rede da nanomedicina, assim como os mecanismos de endocitose de uma forma generalizada. Por fim, relatou-se o tópico *cutting-edge* da *cross-presentation*, uma hipótese sugerida nos anos 70 para explicar alguns paradoxos do campo da imunologia, agora confirmada, e com fortes possibilidades de levar resultados de estudos de bancada de laboratório para a clínica.

No futuro próximo, novas formulações de vacinas contendo nanopartículas, com implicação profilática ou preventiva, chegarão ao mercado. E se os laboriosos ensaios clínicos impedem muitas vezes que novas tecnologias sejam aplicadas na saúde pública assim que são anunciadas, nunca é de mais ressaltar que são regulamentações necessárias, pelo menos enquanto não houver novas plataformas de testes que substituam os habituais modelos *in vitro* e *in vivo*...



Referências bibliográficas

- Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D., & Krishnan, K. M. (2015). In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev*, *44*(23), 8576-8607. doi: 10.1039/c5cs00541h
- Benjaminsen, R. V., Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M., & Andresen, T. L. (2013). The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular Therapy*, *21*(1), 149-157. doi: 10.1038/mt.2012.185
- Benne, N., van Duijn, J., Kuiper, J., Jiskoot, W., & Slutter, B. (2016). Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J Control Release*, *234*, 124-134. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033
- Borges, O., Lebre, F., Bento, D., Borchard, G., & Junginger, H. E. (2010). Mucosal vaccines: recent progress in understanding the natural barriers. *Pharm Res*, *27*(2), 211-223. doi: 10.1007/s11095-009-0011-3
- Burgdorf, S., & Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, *20*(1), 89-95. doi: 10.1016/j.coi.2007.12.002
- Canton, I., & Battaglia, G. (2012). Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*, *41*(7), 2718-2739. doi: 10.1039/c2cs15309b
- Chen, J., Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A., . . . Li, X. (2007). Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano Letters*, *7*(5), 1318-1322. doi: 10.1021/nl070345g
- Chosewood, L. C., Wilson, D. E., Centers for Disease, C., Prevention, & Health, N. I. o. (2009). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. [Washington D.C.]: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health : [For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O.].
- Chow, A., Brown, B. D., & Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews: Immunology*, *11*(11), 788-798. doi: 10.1038/nri3087
- Cruz, L. J., Tacken, P. J., Fokkink, R., & Figdor, C. G. (2011). The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells. *Biomaterials*, *32*(28), 6791-6803. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.082
- Dobrovolskaia, M. A., McNeil, S. E., & World, S. (2013). Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials.
- Dobrovolskaia, M. A., Shurin, M., & Shvedova, A. A. (2016). Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *299*, 78-89. doi: 10.1016/j.taap.2015.12.022
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, *78*, 857-902. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540
- Douglas, K. L., Piccirillo, C. A., & Tabrizian, M. (2008). Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur J Pharm Biopharm*, *68*(3), 676-687. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.09.002
- Duncan, R., & Richardson, S. C. (2012). Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges. *Molecular Pharmaceutics*, *9*(9), 2380-2402. doi: 10.1021/mp300293n
- Fernandez, T. D., Pearson, J. R., Leal, M. P., Torres, M. J., Blanca, M., Mayorga, C., & Le Guevel, X. (2015). Intracellular accumulation and immunological properties of fluorescent gold nanoclusters in human dendritic cells. *Biomaterials*, *43*, 1-12. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.045



- Fielding, A. B., & Royle, S. J. (2013). Mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(18), 3423-3433. doi: 10.1007/s00018-012-1250-8
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., . . . Plebanski, M. (2004). Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *Journal of Immunology*, 173(5), 3148-3154.
- Franca, A., Aggarwal, P., Barsov, E. V., Kozlov, S. V., Dobrovolskaia, M. A., & Gonzalez-Fernandez, A. (2011). Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro. *Nanomedicine (Lond)*, 6(7), 1175-1188. doi: 10.2217/nnm.11.41
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., . . . Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell*, 102(3), 325-334.
- Gordon, S., Saupe, A., McBurney, W., Rades, T., & Hook, S. (2008). Comparison of chitosan nanoparticles and chitosan hydrogels for vaccine delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(12), 1591-1600. doi: 10.1211/jpp/60.12.0004
- Greenwood, B. (2014). The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1645), 20130433. doi: 10.1098/rstb.2013.0433
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., . . . Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews: Immunology*, 14(8), 571-578. doi: 10.1038/nri3712
- Halbert, C. L., Rutledge, E. A., Allen, J. M., Russell, D. W., & Miller, A. D. (2000). Repeat Transduction in the Mouse Lung by Using Adeno-Associated Virus Vectors with Different Serotypes. *Journal of Virology*, 74(3), 1524-1532.
- He, Q., Gao, Y., Zhang, L., Zhang, Z., Gao, F., Ji, X., . . . Shi, J. (2011). A pH-responsive mesoporous silica nanoparticles-based multi-drug delivery system for overcoming multi-drug resistance. *Biomaterials*, 32(30), 7711-7720. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.066
- Hillaireau, H., & Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), 2873-2896. doi: 10.1007/s00018-009-0053-z
- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., . . . West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13549-13554. doi: 10.1073/pnas.2232479100
- Hu, Y., Litwin, T., Nagaraja, A. R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N., & Irvine, D. J. (2007). Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core-shell nanoparticles. *Nano Letters*, 7(10), 3056-3064. doi: 10.1021/nl071542i
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med Sci*, 23(3), 217-228. doi: 10.1007/s10103-007-0470-x
- Jayakumar, R., Chennazhi, K. P., Muzzarelli, R. A. A., Tamura, H., Nair, S. V., & Selvamurugan, N. (2010). Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.026>
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews: Immunology*, 12(8), 557-569. doi: 10.1038/nri3254
- Joshi, M. D., Unger, W. J., Storm, G., van Kooyk, Y., & Mastrobattista, E. (2012). Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *J Control Release*, 161(1), 25-37. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.010
- Kennedy, L. C., Bickford, L. R., Lewinski, N. A., Coughlin, A. J., Hu, Y., Day, E. S., . . . Drezek, R. A. (2011). A new era for cancer treatment: gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small*, 7(2), 169-183. doi: 10.1002/smll.201000134
- Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., & Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological Reviews*, 58(1), 32-45. doi: 10.1124/pr.58.1.8



- Kim, B., Lee, N., Kim, H., An, K., Park, Y., Choi, Y., . . . Na, H. (2011). Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(32), 12624.
- Kurts, C., Robinson, B. W., & Knolle, P. A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nature Reviews: Immunology*, *10*(6), 403-414. doi: 10.1038/nri2780
- Li, A. V., Moon, J. J., Abraham, W., Suh, H., Elkhader, J., Seidman, M. A., . . . Irvine, D. J. (2013). Generation of Effector Memory T Cell–Based Mucosal and Systemic Immunity with Pulmonary Nanoparticle Vaccination. *Sci Transl Med*, *5*(204), 204ra130-204ra130. doi: 10.1126/scitranslmed.3006516
- Liong, M., Lu, J., Kovoichich, M., Xia, T., Ruehm, S. G., Nel, A. E., . . . Zink, J. I. (2008). Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*, *2*(5), 889-896. doi: 10.1021/nn800072t
- Lucas, W. (2001). *Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function* eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C., Beil, J., Delacher, M., Tron, K., . . . Simmet, T. (2011). Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS Nano*, *5*(3), 1657-1669. doi: 10.1021/nn2000756
- Manmohan, S. (2013). Novel immune potentiators and delivery technologies for next generation vaccines.
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., & Fernandes, J. C. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm*, *57*(1), 1-8.
- Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., & Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, *22*(3), 411-416. doi: 10.1016/j.coi.2010.04.004
- Mellman, I., & Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, *106*(3), 255-258.
- Mercer, J., & Greber, U. F. (2013). Virus interactions with endocytic pathways in macrophages and dendritic cells. *Trends in Microbiology*, *21*(8), 380-388. doi: 10.1016/j.tim.2013.06.001
- Monnard, P. A., & Deamer, D. W. (2002). Membrane self-assembly processes: steps toward the first cellular life. *Anat Rec*, *268*(3), 196-207. doi: 10.1002/ar.10154
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, *1*, 27. doi: 10.4103/2277-9175.98152
- Nel, A. E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., . . . Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, *8*(7), 543-557. doi: 10.1038/nmat2442
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Advances in Immunology*, *96*, 179-204. doi: 10.1016/s0065-2776(07)96005-8
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews: Immunology*, *8*(1), 34-47. doi: 10.1038/nri2206
- Nishioka, Y., & Yoshino, H. (2001). Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Adv Drug Deliv Rev*, *47*(1), 55-64.
- O'Hagan, D. T., & De Gregorio, E. (2009). The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. *Drug Discovery Today*, *14*(11-12), 541-551. doi: 10.1016/j.drudis.2009.02.009
- Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine*, *9 Suppl 1*, 51-63. doi: 10.2147/ijn.s26592
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., & Jones, P. P. (2013). *Kuby immunology*. Houndmills, Basingstoke: Macmillan Higher Education.



- Owens, D. E., 3rd, & Peppas, N. A. (2006). Osonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *307*(1), 93-102. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- Panariti, A., Misericocchi, G., & Rivolta, I. (2012). The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl*, *5*, 87-100. doi: 10.2147/NSA.S25515
- Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, *55*(3), 329-347.
- Peetla, C., Vijayaraghavalu, S., & Labhasetwar, V. (2013). Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, *65*(13-14), 1686-1698. doi: 10.1016/j.addr.2013.09.004
- Peters, W., Scallan, C. D., & Tucker, S. N. (2013). Oral Vaccination: Attenuated and Gene-Based. In M. Singh (Ed.), *Novel Immune Potentiators and Delivery Technologies for Next Generation Vaccines* (pp. 81-104). Boston, MA: Springer US.
- Pichon, C., Billiet, L., & Midoux, P. (2010). Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(5), 640-645. doi: 10.1016/j.copbio.2010.07.003
- Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A. D., . . . Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(9), 4287-4292. doi: 10.1073/pnas.0910609107
- Pulendran, B., & Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*, *12*(6), 509-517.
- Rappuoli, R., Pizza, M., Del Giudice, G., & De Gregorio, E. (2014). Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(34), 12288-12293. doi: 10.1073/pnas.1402981111
- Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., & Saraf, S. (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *29*(9), 1790-1798.
- Reddy, S. T., Swartz, M. A., & Hubbell, J. A. (2006). Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends in Immunology*, *27*(12), 573-579. doi: 10.1016/j.it.2006.10.005
- Reddy, S. T., van der Vlies, A. J., Simeoni, E., Angeli, V., Randolph, G. J., O'Neil, C. P., . . . Hubbell, J. A. (2007). Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nature Biotechnology*, *25*(10), 1159-1164. doi: 10.1038/nbt1332
- Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization behavior of chitosan and chitosan-DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. *Biomacromolecules*, *14*(6), 1732-1740. doi: 10.1021/bm4000713
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., & Benoit, J. P. (2010). Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine (Lond)*, *5*(2), 287-306. doi: 10.2217/nnm.09.110
- Rollier, C. S., Reyes-Sandoval, A., Cottingham, M. G., Ewer, K., & Hill, A. V. (2011). Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Current Opinion in Immunology*, *23*(3), 377-382. doi: 10.1016/j.coi.2011.03.006
- Satpathy, A. T., Wu, X., Albring Jö, C., & Murphy, K. M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature Immunology*, *13*(12), 1145-1154. doi: 10.1038/ni.2467
- Savina, A., & Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews*, *219*, 143-156. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x
- Segura, E., & Amigorena, S. (2014). Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunology Letters*, *158*(1-2), 73-78. doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.001



- Silva, A. L., Soema, P. C., Slutter, B., Ossendorp, F., & Jiskoot, W. (2016). PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother*, *12*(4), 1056-1069. doi: 10.1080/21645515.2015.1117714
- Silva, J. M., Vandermeulen, G., Oliveira, V. G., Pinto, S. N., Rodrigues, C., Salgado, A., . . . Florindo, H. F. (2014). Development of functionalized nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells: a mechanistic approach. *Nanomedicine (Lond)*, *9*(17), 2639-2656. doi: 10.2217/nnm.14.135
- Singh, R., & Lillard, J. W., Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*, *86*(3), 215-223. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004
- Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M., & Parak, W. J. (2008). Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev*, *37*(9), 1896-1908. doi: 10.1039/b712170a
- Steinman, R. M., & Idoyaga, J. (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunological Reviews*, *234*(1), 5-17. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00888.x
- Swartz, M. A. (2001). The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev*, *50*(1-2), 3-20.
- Szachowicz-Petelska, B., Figaszewski, Z., & Lewandowski, W. (2001). Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, *222*(2), 169-182.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., . . . Henri, S. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, *39*(5), 925-938. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.004
- Thomann-Harwood, L. J., Kaeuper, P., Rossi, N., Milona, P., Herrmann, B., & McCullough, K. C. (2013). Nanogel vaccines targeting dendritic cells: contributions of the surface decoration and vaccine cargo on cell targeting and activation. *J Control Release*, *166*(2), 95-105. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.11.015
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews: Genetics*, *4*(5), 346-358. doi: 10.1038/nrg1066
- Treuel, L., Jiang, X., & Nienhaus, G. U. (2013). New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface*, *10*(82). doi: 10.1098/rsif.2012.0939
- Trombetta, E. S., & Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*, *23*, 975-1028. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538
- Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews: Immunology*, *12*(7), 492-502. doi: 10.1038/nri3244
- Uskokovic, V. (2013). Entering the era of nanoscience: time to be so small. *J Biomed Nanotechnol*, *9*(9), 1441-1470.
- Vallhov, H., Qin, J., Johansson, S. M., Ahlborg, N., Muhammed, M. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2006). The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano Letters*, *6*(8), 1682-1686. doi: 10.1021/nl060860z
- Veronese, F. M., & Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, *10*(21), 1451-1458. doi: 10.1016/s1359-6446(05)03575-0
- Vives, E. (2003). Cellular uptake [correction of utake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J Mol Recognit*, *16*(5), 265-271. doi: 10.1002/jmr.636
- Waehler, R., Russell, S. J., & Curiel, D. T. (2007). Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews: Genetics*, *8*(8), 573-587. doi: 10.1038/nrg2141
- Wang, F., Wang, Y. C., Dou, S., Xiong, M. H., Sun, T. M., & Wang, J. (2011). Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS Nano*, *5*(5), 3679-3692. doi: 10.1021/nn200007z



- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, *6*, 765-774. doi: 10.2147/ijn.s17296
- Whiteaker, J. R., Zhang, H., Eng, J. K., Fang, R., Piening, B. D., Feng, L. C., . . . Paulovich, A. G. (2007). Head-to-head comparison of serum fractionation techniques. *J Proteome Res*, *6*(2), 828-836. doi: 10.1021/pr0604920
- Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., & Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods*, *40*(1), 1-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.05.016
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews: Genetics*, *15*(8), 541-555. doi: 10.1038/nrg3763
- Yue, H., Wei, W., Fan, B., Yue, Z., Wang, L., Ma, G., & Su, Z. (2012). The orchestration of cellular and humoral responses is facilitated by divergent intracellular antigen trafficking in nanoparticle-based therapeutic vaccine. *Pharmacological Research*, *65*(2), 189-197. doi: 10.1016/j.phrs.2011.09.008
- Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Lv, P., Wang, L., Ma, G., & Su, Z. (2010). Particle size affects the cellular response in macrophages. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *41*(5), 650-657. doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.006
- Yue, Z. G., Wei, W., Lv, P. P., Yue, H., Wang, L. Y., Su, Z. G., & Ma, G. H. (2011). Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, *12*(7), 2440-2446. doi: 10.1021/bm101482r
- Zaki, N. M., Nasti, A., & Tirelli, N. (2011). Nanocarriers for cytoplasmic delivery: cellular uptake and intracellular fate of chitosan and hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles in a phagocytic cell model. *Macromolecular Bioscience*, *11*(12), 1747-1760. doi: 10.1002/mabi.201100156
- Zhang, L. W., Baumer, W., & Monteiro-Riviere, N. A. (2011). Cellular uptake mechanisms and toxicity of quantum dots in dendritic cells. *Nanomedicine (Lond)*, *6*(5), 777-791. doi: 10.2217/nnm.11.73
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., & Zhao, Y. (2011). Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*, *7*(10), 1322-1337. doi: 10.1002/sml.201100001
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, *32*(3), 327-337. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069