

Mariana Castilho Mamede Xavier de Sá

Novos sistemas terapêuticos de administração transcutânea

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014



Mariana Castilho Mamede Xavier de Sá

Novos sistemas terapêuticos de administração transcutânea

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Mariana Castilho Mamede Xavier de Sá

Novos sistemas terapêuticos de administração transcutânea

---

Mariana Castilho Mamede Xavier de Sá

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Eliana Souto.

## Resumo

A pele tem sido cada vez mais, uma alternativa para administração de fármacos. A administração transcutânea é uma das vias de administração cutânea, que visa a cedência de fármacos para a epiderme ou derme, onde vão exercer o seu efeito a nível local ou sistémico. Para que os fármacos exerçam o seu efeito, nos locais alvo, têm que atravessar o estrato córneo e como tal, têm que ser vectorizados recorrendo-se assim, à nanomedicina.

A nanomedicina é a área de investigação científica, que se dedica à produção e caracterização de partículas de tamanho nanométrico para inúmeras aplicações biomédicas. Nanopartículas poliméricas, lipídicas e metálicas, bem como lipossomas e outros sistemas, têm sido testados como vectores de fármacos, sobretudo na administração de vacinas e em doenças do foro reumatológico, como por exemplo na artrite reumatóide.

A imunização transcutânea é uma das aplicações das nanopartículas. É uma alternativa à imunização por via intramuscular e subcutânea, uma vez que a pele apresenta características imunológicas únicas. Para a formulação destas vacinas, são usados inúmeros tipos de adjuvantes e promotores que ajudam a atravessar o estrato córneo, permitindo chegar aos locais alvo. A imunização transcutânea é vista então como uma alternativa adequada, uma vez que permite a auto-administração, é indolor e não é invasiva.

A artrite reumatóide é uma doença auto-imune, crónica, que leva à degradação das cartilagens e à erosão óssea. É uma doença sem cura, e como tal, requer tratamentos contínuos. Existem várias classes de fármacos (anti-inflamatórios não esteróides, fármacos modificadores da evolução da doença reumatisal, corticoesteróides e fármacos biológicos, do qual fazem parte proteínas complexas) usados para travar a sua evolução. Muitos destes fármacos têm efeitos secundários sistémicos e para ultrapassar esta desvantagem, foram desenvolvidas formulações nanométricas, de forma a serem usadas através da administração transcutânea. Assim, consegue-se uma via mais

cómoda para os pacientes, diminuindo os efeitos secundários, uma vez que actuam apenas nas membranas inflamadas.

**Palavras-chave:** Imunização Transcutânea, Vacinação, Nanopartículas, Artrite Reumatóide, Anti-inflamatórios não esteróides, Fármacos anti-reumáticos.

## Abstract

The skin has been a suitable alternative for drug delivery. Transcutaneous administration is one of the possible cutaneous routes, aiming at drug delivery to epidermis or dermis, where the molecules are expected to have their local or systemic effects. In order to reach their target, drugs are expected to cross the stratum corneum; thus, being Nanomedicine a suitable approach.

Nanomedicine is the research area focusing on the production and characterization of particles of nanometer size range, for a wide variety of biomedical applications. Polymeric, lipidic and metallic nanoparticles, as well as liposomes and other systems, have been tested as drug delivery systems, in particular for vaccines and for the treatment of rheumatic disturbances, such as rheumatoid arthritis.

Transcutaneous immunization is one of the possible applications of nanoparticles. It is one alternative over intramuscular and subcutaneous immunization, since the skin gathers unique immunological properties. For the formulation of these vaccines, several penetration enhancers help to cross stratum corneum and allowing reaching the target. Transcutaneous immunization is considered as a suitable alternative since in allows self-medication, it is neither painful nor invasive.

Rheumatoid arthritis is a chronic and autoimmune disease, characterized by cartilage degradation and bone erosion. It has no cure and therefore requires non-stop treatment. Several drugs (non-steroidal anti-inflammatory drugs, disease-modifying antirheumatic drugs, corticosteroids and other bioactives such as proteins) may be used to delay the development of the disease. Many of these drugs have systemic adverse side effects and to overcome this disadvantage, formulations of nanometer size have been developed for transcutaneous administration. As such, this route demonstrates a higher patient compliance to the treatment, with reduced side effects since the drugs will only act in the inflamed membranes.

**Keywords:** Transcutaneous immunization, vaccination, nanoparticles, rheumatoid arthritis, non-steroidal anti-inflammatory drugs, anti-rheumatic drugs

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Professora Doutora Eliana Souto, por toda a orientação e disponibilidade ao longo da elaboração deste projecto.

Aos meus pais pela oportunidade que me concederam, porque sem eles nada seria possível.

Aos meus amigos, Joana e Tomás, pelos cinco anos de estudo, bons momentos e amizade.

Ao Manuel, por toda a paciência e dedicação nos últimos anos.

## ÍNDICE GERAL

<b>Resumo .....</b>	<b>V</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VII</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>IX</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>XII</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>XV</b>
<b>I. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Administração transcutânea.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Permeação vs. Penetração .....</b>	<b>5</b>
<b>III. Novas abordagens terapêuticas.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Vacinação transcutânea.....</b>	<b>8</b>
i. Pele como órgão imunológico .....	9
ii. Mecanismo de acção da imunização transcutânea .....	10
iii. Adjuvantes da imunização transcutânea.....	11
A. Promotores Físicos .....	12
a. Ultrassons.....	13
b. <i>Jet injector</i> .....	14
c. Electroporação .....	15
d. Microagulhas .....	17
e. Laser.....	20
iv. Novas Formulações .....	20
A. <i>Patch</i> .....	21
B. Nanopartículas .....	21
a. Nanopartículas poliméricas de Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) e Ácido poli(láctico) .....	22
b. Nanopartículas biodegradáveis de quitosano.....	22
c. Nanopartículas metálicas .....	23
d. Outras nanopartículas .....	23
C. Nanovectores vesiculares .....	23
a. Lipossomas .....	24
b. Niossomas .....	24
D. Microemulsões .....	24
E. Outras formulações.....	25

<b>2. Doenças do foro reumatológico.....</b>	<b>26</b>
i. Artrite reumatóide .....	26
ii. Tratamento .....	28
A. Anti-inflamatórios não esteróides.....	28
B. Glucocorticóides.....	32
C. Fármacos modificadores da evolução da doença reumatismal.....	33
D. Fármacos biológicos.....	33
iii. Promotores da administração dérmica .....	34
A. Promotores Químicos .....	34
B. Promotores Físicos .....	34
iv. Novas formulações.....	35
A. Microemulsões .....	36
B. Nanovectores vesiculares .....	36
a. Lipossomas .....	36
b. Niossomas.....	37
c. Transferossomas.....	38
d. Etossomas .....	38
C. Nanovectores lipídicos .....	39
<b>3. Tendinites.....</b>	<b>41</b>
<b>IV. Conclusões e perspectivas futuras.....</b>	<b>43</b>
<b>V. Bibliografia.....</b>	<b>45</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da estrutura da pele (adaptada de <a href="http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas_da_pele.jpg">http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas_da_pele.jpg</a> ). .....	2
<b>Figura 2</b> – Representação logarítmica de invasores da pele (linha superior), de estruturas características da pele (linha intermédia) e vectores de fármacos (linha inferior) (adaptada de Cevc e Vierl, 2010). .....	3
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas e possíveis modificações (adaptada de Papakostas <i>et al</i> , 2011). .....	5
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática das vias possíveis para o transporte de substâncias através do estrato córneo (adaptada de <a href="http://www.intechopen.com/books/6-recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/niosomes-as-carrier-in-dermal-drug-delivery">http://www.intechopen.com/books/6-recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/niosomes-as-carrier-in-dermal-drug-delivery</a> ). .....	6
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática de vários processos físicos e sistemas, desenvolvidos para a imunização transcutânea (adaptada de Bal <i>et al</i> , 2010b). .....	13
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática da administração transcutânea através do <i>jet injector</i> de partículas sólidas. (a) ejeção de partículas através do bocal, (b) partículas colidem com a superfície da pele, conduzindo à formação de um orifício, (c) penetração das partículas no estrato córneo, (d) as partículas são distribuídas para camadas mais profundas da pele (adaptada de Kale e Momin, 2014). .....	14
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da administração transcutânea através do <i>jet injector</i> de formas líquidas. (a) formação do jacto líquido, (b) formação de um orifício na pele devido ao impacto do jacto, (c) avanço da injeção ao longo das camadas cutâneas, (d) deposição das substância em camadas mais profunda da pele (adaptada de Kale e Momin, 2014). .....	15
<b>Figura 9</b> - Imagem microscópica do rearranjo estrutural da membrana celular pelo método de electroporação (adaptada de <a href="http://gmcrops.yolasite.com/methods-of-genetic-engineering">http://gmcrops.yolasite.com/methods-of-genetic-engineering</a> ). .....	16

<b>Figura 10</b> – Representação esquemática de aparelhos para vacinação (adaptada de Hirobe <i>et al</i> , 2013). .....	16
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática da imunização transcutânea recorrendo a microagulhas sólidas. A distribuição do antígeno é feita através das fendas criadas através das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe <i>et al</i> , 2013).....	18
<b>Figura 12</b> – Representação esquemática da imunização transcutânea recorrendo a microagulhas ocas. O antígeno entra na pele através das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe <i>et al</i> , 2013).....	18
<b>Figura 13</b> – Representação esquemática da imunização transcutânea recorrendo a microagulhas revestidas. O antígeno difunde-se na pele através das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe <i>et al</i> , 2013).....	19
<b>Figura 14</b> – Representação esquemática de microagulhas absorvíveis. O antígeno entra na pele através da dissolução das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe <i>et al</i> , 2013). .....	20
<b>Figura 15</b> – Representação esquemática dos sistemas convencionais e os novos para transporte de fármacos dérmicos (adaptada de Okyar <i>et al</i> , 2012). .....	35

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Tabela representativa dos adjuvantes imunológicos usados na imunização transcutânea APCs – Células apresentadoras de antígeno; CpG ODN – CpG oligonucleótidos CT – <i>Vibrio cholerae</i> , toxina da cólera; CT-B – subunidade B da toxina da cólera; IFN – interferão; IL – interleucina; LPS – lipopolissacarídeo; LT – enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> ; LT-B – subunidade B da enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> ; TNF – factor de necrose tumoral. (adaptada de Li <i>et al</i> , 2011). .....	12
<b>Tabela 2</b> – Tabela representativa das opções de tratamento para a artrite reumatóide. AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides; DMARDs – fármacos modificadores da evolução da doença reumatisal. (adaptada de Mitragotri e Yoo, 2011).....	28
<b>Tabela 3</b> – Tabela representativa de formulações dérmicas de anti-inflamatórios não esteróides comercializadas (adaptado de Okyar <i>et al</i> , 2012). .....	30
<b>Tabela 4</b> – Tabela representativa dos estudos sobre o desenvolvimento de nanotransportadores de anti-inflamatórios não esteróides para melhorar a permeabilidade da pele. NLC – vectores lipídicos nanoestruturados; SLN – nanopartículas de lipídeos sólidos. (adaptada de Okyar <i>et al</i> , 2012). .....	40

## Lista de Abreviaturas

µm – Micrómetro

nm – Nanómetro

mA/cm<sup>2</sup> – Miliamper por centímetro quadrado

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APCs – Células apresentadoras de antígeno (do Inglês, *Antigen Presentig Cells*)

AR – Artrite reumatóide

ARN – Ácido ribonucleico

Au-NPs – Nanopartículas de ouro (Au) (do Inglês, *Gold (Au) Nanoparticles*)

BSI – *British Standards Instituion*

COX – Ciclooxigenase

COXIBs – Inibidores selectivos da COX-2

Da – Dalton

dDCs – Células dendríticas dérmicas (do Inglês, *Dermal Dendritic Cells*)

DMARDs – Fármacos modificadores da evolução da doença reumatisal (do Inglês, *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*)

EC – Estrato córneo

IFN – Interferão (do Inglês, *Interferon*)

IL – Interleucinas

IM – Intramuscular

iNOS – Óxido Nítrico Sintetase Induzida (do Inglês, *Nitric Oxide Synthase*)

ISCOMs – Complexos imunoestimulantes (do Inglês, *Immune Stimulating Complexes*)

LbL – Camada por camada (do Inglês, *Layer-by-Layer*)

LC – Células de Langerhans (do Inglês, *Langerhans Cells*)

NLC – Vectores lipídicos nanoestruturados (do Inglês, *Nanostructured Lipid Carriers*)

OVA – Ovalbumina (do Inglês *Ovalbumin*)

PGS – Prostaglandinas

PLA – Ácido poli(láctico) (do Inglês, *Poly(lactic acid)*)

PLGA – Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (do Inglês, *Poly(lactic-co-glycolic Acid)*)

PLP – Partição-Lípido-Proteína

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SLN – Nanopátículas de lipídeos sólidos (do Inglês, *Solid Lipid Nanoparticles*)

TCI – Imunização transcutânea (do Inglês, *Transcutaneous Immunization*)

TLR – Receptores tipo toll (do Inglês, *Toll-like Receptors*)

TNF – Factor de necrose tumoral (do Inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

## I. Introdução

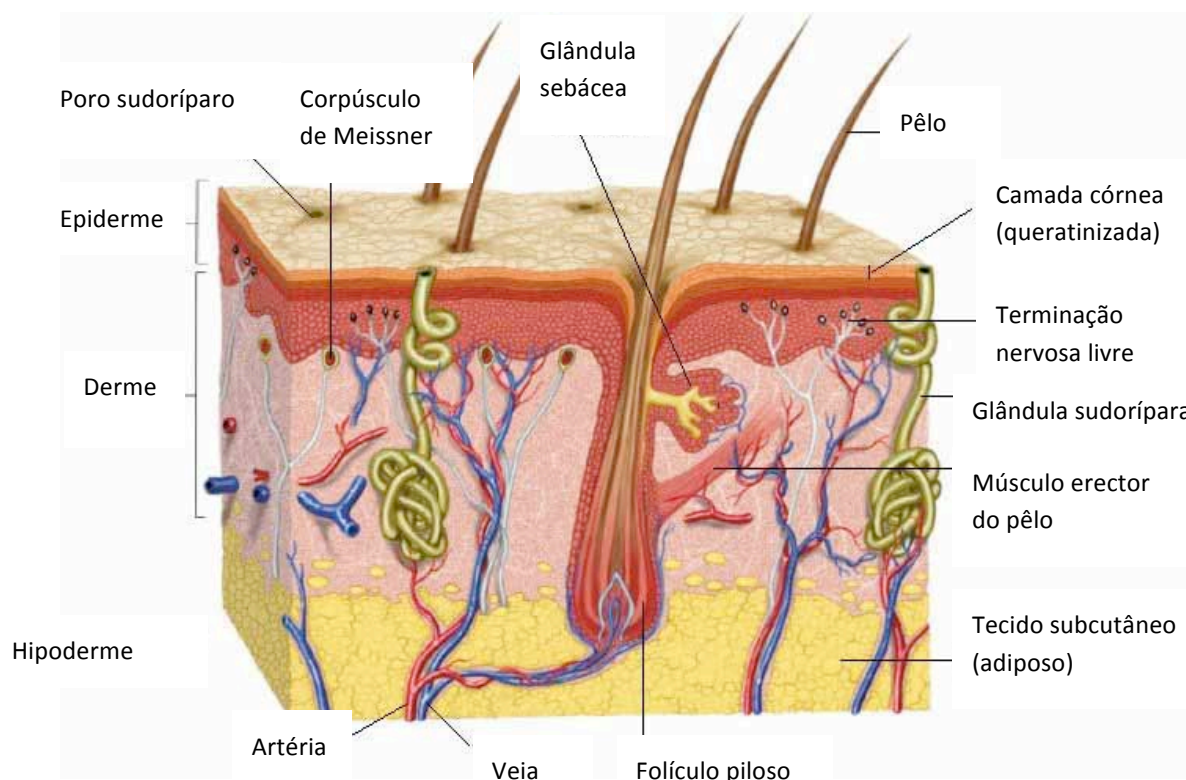
A pele é o maior órgão do nosso corpo. Representa a camada mais externa, que funciona como barreira física entre o corpo e o ambiente envolvente. Protege-nos contra impactos mecânicos externos, radiação ultravioleta, desidratação e microrganismos. A pele consiste em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

A epiderme é a camada mais superficial da pele e a sua espessura varia entre 50 a 150  $\mu\text{m}$ . A função de barreira da pele é assegurada por uma espessura entre os 15-20  $\mu\text{m}$ , o estrato córneo (EC). Esta camada consiste em células epiteliais rígidas ligadas por desmossomas, conhecidas como corneócitos, envoltos numa estrutura lamelar muito organizada formada por lipídeos intercelulares. O arranjo desta camada resulta numa barreira praticamente impermeável que reduz a passagem das moléculas, especialmente moléculas maiores que 500 Da (Bos e Meinardi, 2000).

Debaixo do EC reside a epiderme viável, onde o principal tipo de células presente são os queratinócitos. Contudo, os melanócitos, as células de Merkel e de Langerhans (*Langerhans Cells* – LCs), apesar de menos abundantes, apresentam um papel importante no funcionamento da epiderme. Seguidamente localiza-se a derme, da qual fazem parte células como os fibroblastos, os mastócitos e as células dendríticas dérmicas (*Dermal Dendritic Cells* – dDCs). A derme também contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e um elevado número de fibras, sendo a camada onde ocorre a maior parte das trocas celulares e fluidas. Depois da derme encontra-se a hipoderme, tecido gordo subcutâneo, que consiste numa montagem de adipócitos ligados por fibras de colagénio. Esta última camada funciona como barreira térmica, mas também armazena energia actuando como “almofada” mecânica para o corpo.

Os apêndices cutâneos, como as glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos, são estruturas penetradas na pele com origem na derme ou na hipoderme. Estes apêndices formam importantes discontinuidades na estrutura da pele (Bal *et al*, 2010b)

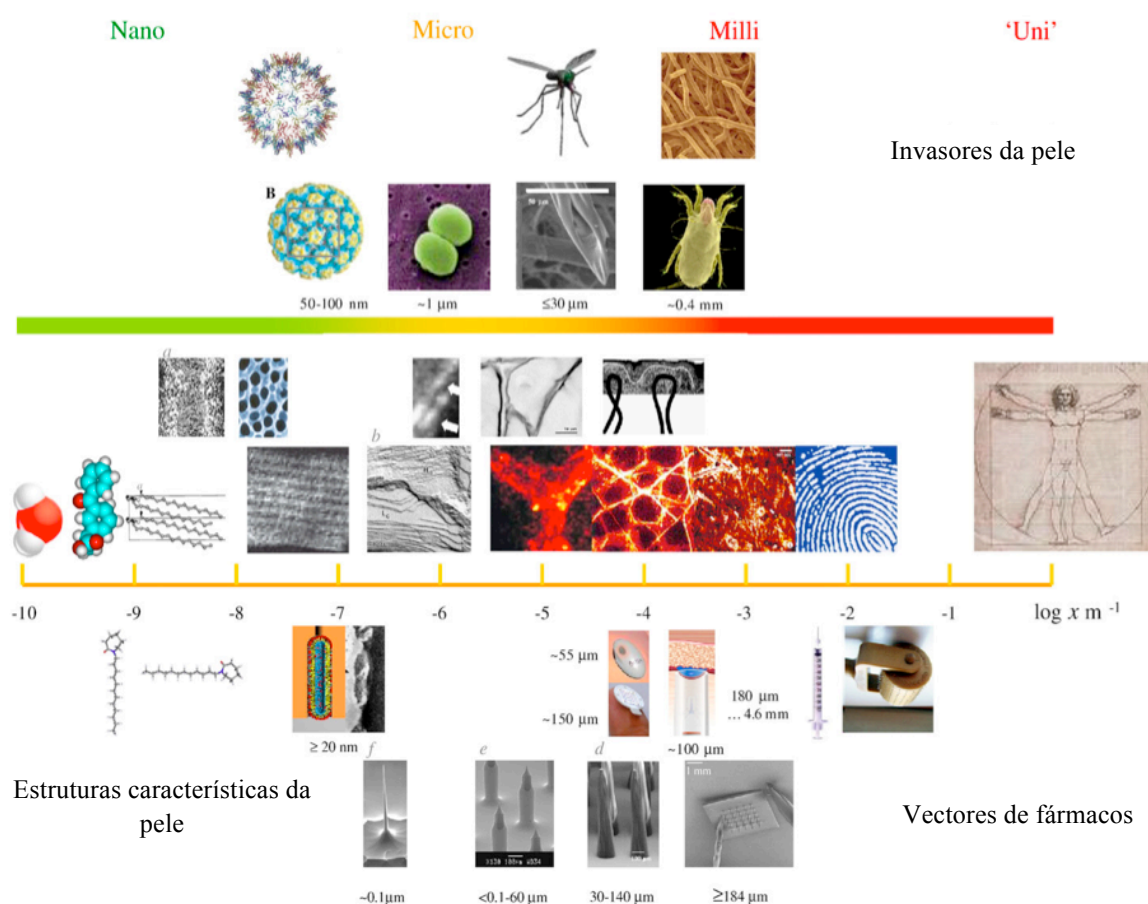
Existem duas abordagens na administração de fármacos através da pele, designadamente; (i) a administração dérmica, na qual a formulação aplicada garante a localização dos fármacos nas camadas dérmicas, e (ii) a administração transdérmica, na qual os fármacos chegam à derme através de vectores entrando depois na corrente sanguínea (Williams, 2003).



**Figura 1** – Representação esquemática da estrutura da pele (adaptada de [http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas\\_da\\_pele.jpg](http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas_da_pele.jpg)).

Os recentes avanços no campo da farmacologia e da nanomedicina têm chamado a atenção para as nanopartículas como novos vectores de fármacos. Os vectores de fármacos permitem a libertação controlada de fármaco durante um período de tempo devido à sua capacidade de depósito, conseguindo assim, atingir um nível constante de fármaco no tecido (Hoffman, 2008).

O termo partícula deriva da palavra Latina *particula*, que significa uma parte pequena. Uma partícula é portanto definida como um pequeno objecto que se comporta como um todo, e no qual em escala nanométrica é geralmente descrito como nanopartícula (Papakostas *et al*, 2011). Para estas partículas, a *British Standards Institution* (BSI) estabeleceu 100 nm como limite superior e 1 nm como limite inferior. Partículas com dimensões superiores ao limite são consideradas micropartículas (Papakostas *et al*, 2011). (Figura 2)



**Figura 2** – Representação logarítmica de invasores da pele (linha superior), de estruturas características da pele (linha intermédia) e vectores de fármacos (linha inferior) (adaptada de Cevc e Vierl, 2010).

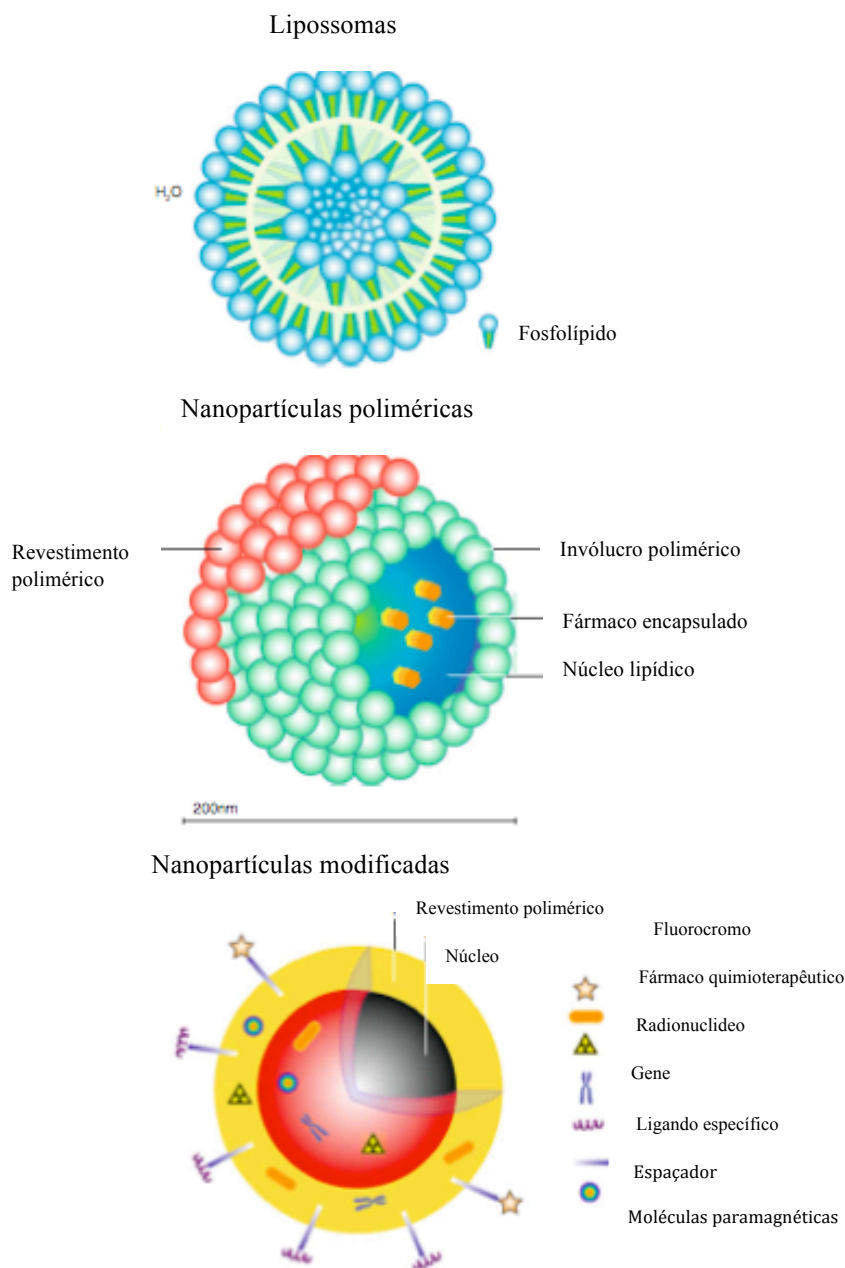
Têm sido usados diversos materiais, como por exemplo, polímeros, lipídeos, metais e cerâmicas, para o desenvolvimento de diferentes tipos de vectores de fármacos.

As partículas podem ser divididas em orgânicas e inorgânicas, ou podem ser classificadas de acordo com a sua forma, tamanho, carga de superfície, bem como pelas propriedades físico-químicas.

Do ponto de vista da interacção entre partículas com superfícies biológicas e barreiras como a pele, poderá ser útil distingui-las entre partículas moles e partículas rígidas. Em geral, as partículas moles são feitas de materiais orgânicos, como lipídeos, proteínas e polímeros, podendo temporariamente alterar a sua forma por “*stress*” ou contacto com superfícies. As partículas rígidas são feitas de materiais inorgânicos e não deformáveis (Papakostas *et al*, 2011), são estruturas coloidais de vários materiais como metais (ouro, prata), óxidos metálicos (óxido ferro) ou cerâmicos (sílica). A encapsulação de fármacos no núcleo de nanopartículas ou a sua adsorção à superfície permite a cedência e a distribuição de várias substâncias evitando a metabolização e a degradação do fármaco no tecido (Figura 3).

Os pontos quânticos são os novos materiais semicondutores nanocristalinos com características únicas de espectroscopia, bem como propriedades ópticas (Zhou *et al*, 2007) fazendo deles bons candidatos para aplicação no diagnóstico e na distribuição (Walther *et al*, 2008).

Através da modificação da superfície das partículas e da adição de ligandos específicos, como anticorpos monoclonais, pode ser conseguido um alvo activo de uma população celular específica (Mohamed e van der Walle, 2006). As nanopartículas não são apenas óptimos vectores de fármacos. Há evidências científicas que lhes atribuem propriedades imunogénicas sendo capazes de influenciar a direcção da resposta imunológica através das células apresentadoras de antígeno (*Antigen Presenting Cells – APCs*) (Kanchan e Panda, 2007). Desde que os nanovectores provaram ser uma mais-valia para a optimização de formulações galénicas, correntes em dermatoterapia, têm sido investigados nanomateriais ideais para este efeito (Papakostas *et al*, 2011).



**Figura 3** – Representação esquemática dos tipos de nanopartículas e possíveis modificações (adaptada de Papakostas *et al*, 2011).

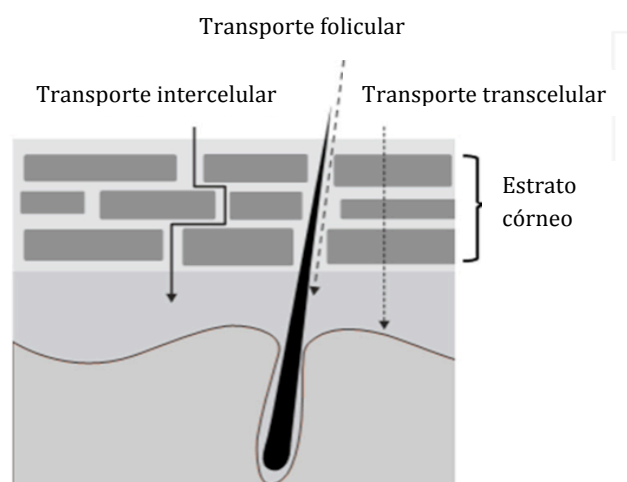
## II. Administração transcutânea

### 1. Permeação vs. Penetração

O EC representa a principal barreira física da pele. Então para que um fármaco consiga permear através da pele, a difusão através do EC torna-se um passo limitante (Prow *et al*, 2011).

A estrutura achatada e anucleada dos corneócitos é densamente empacotada com uma matriz lipídica extracelular, que é organizada em bicamadas (Elias e Menon, 1991). A esta estrutura dá-se o nome de “*bricks and mortar*” (Prow *et al*, 2011). Os corneócitos são interligados pelos corneodesmosomas, que ajudam a formar uma camada externa forte pela manutenção da forma celular e um armazenamento regular. Uma eventual degradação dos corneodesmosomas por enzimas proteolíticas leva à descamação (Caubet *et al*, 2004).

O transporte de substâncias através do EC ocorre maioritariamente por difusão passiva tendo em conta a sua estrutura “*bricks and mortar*”. Esta estrutura é interrompida por anexos cutâneos, e o transporte de substâncias pode ocorrer por três vias possíveis; (i) via transcelular, (ii) via intercelular e (iii) através dos anexos cutâneos. (Prow *et al*, 2011) (Figura 4).



**Figura 4** – Representação esquemática das vias possíveis para o transporte de substâncias através do estrato córneo (adaptada de <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/niosomes-as-carrier-in-dermal-drug-delivery>).

Os corneócitos cobrem a superfície do EC fazendo uma camada fina, irregular e descontínua, que consiste em secreções das glândulas sebáceas e sudoríparas, juntamente com as bactérias e células mortas da pele. Esta camada é assim considerada como barreira adicional à permeação através do EC (Prow *et al*, 2011).

É importante reconhecer que as camadas da pele abaixo do EC podem ter também um papel importante na penetração, bem como na distribuição dos fármacos administrados topicamente. As camadas mais profundas da pele são importantes na distribuição de fármacos lipófilos, de fármacos com alvo na derme ou tecidos mais profundos, ou fármacos cujo alvo seja a circulação sanguínea (Jepps *et al*, 2013).

A permeação ao longo das camadas celulares, através da epiderme e da derme, depende da afinidade das substâncias com o ambiente lipídico, com o ambiente interno dos corneócitos assim como da capacidade que a molécula tem de permear a parede celular do corneócito (Jepps *et al*, 2013).

A penetração dos fármacos pode ocorrer por duas vias principais, via anexial e via transepidérmica (Meidan *et al*, 1998). A via anexial permite a penetração de substâncias através de anexos cutâneos (folículo piloso, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas) (Marjukka Suhonen *et al*, 1999). Esta via é preferencial para iões e moléculas de elevado peso molecular, assim como para determinados sistemas de veiculação, nomeadamente lipossomas e outras partículas coloidais (Lieb *et al*, 1997;Mura *et al*, 2007). É uma via que apresenta um papel significativo no início da permeação de substâncias porque é mais rápida do que a via transepidérmica, uma vez que a superfície destes anexos cutâneos é mais permeável .

Os anexos cutâneos ocupam apenas 0,1% da superfície da pele humana, assim sendo a via transepidérmica é o principal caminho associado à permeação de fármacos através da pele (Lieb *et al*, 1997;Mura *et al*, 2007).

A via transepidérmica envolve difusão de substâncias através do EC, das camadas celulares viáveis da epiderme e através das camadas mais superficiais da derme, até atingir a circulação sanguínea (Marjukka Suhonen *et al*, 1999;Takatani-Nakase *et al*, 2012;Cevc, 2004). Através do EC, existem dois caminhos, o transcelular (através dos corneócitos e da matriz lipídica) e o intercelular (através dos domínios lipídicos entre os corneócitos) (Marjukka Suhonen *et al*, 1999) (Figura 4). Contudo, para os dois caminhos, a estrutura do EC estabelece que os permeadores têm que se difundir através das camadas intercelulares de lipídeos (Marjukka Suhonen *et al*, 1999).

Para componentes muito hidrófilos, a via preferida é a via intracelular pois apresenta um meio mais hidrófilo, uma vez que os corneócitos são ricos em queratina. A via

intercelular é a alternativa a moléculas apolares, pois o cimento intercelular é rico em lipídeos (Marjukka Suhonen *et al*, 1999).

O transporte ao longo do EC ocorre essencialmente por difusão passiva, independentemente de ser via intercelular (através da matriz lipídica) ou via transcelular (através dos corneócitos e matriz lipídica) (Jepps *et al*, 2013).

### **III. Novas abordagens terapêuticas**

#### **1. Vacinação transcutânea**

As doenças infecciosas são uma ameaça séria para a saúde pública em todo o mundo (Mittal *et al*, 2013). Ao longo dos últimos dois séculos, a vacinação foi uma das intervenções médicas mais bem-sucedidas para reduzir este tipo de doenças (Hilleman, 2000; Ada, 2003), assim como, para melhorar a imunidade para uma doença específica. Várias doenças como o sarampo, a rubéola, o tétano, a tosse convulsa e a febre-amarela estão sob controlo através de muitas vacinas convencionais (Miller e Pisani, 1999). Dentre todas as estratégias para o combate das infecções, apenas a vacinação tem a capacidade de erradicar doenças. Exemplo disso é a erradicação da varíola confirmada em 1979 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Mittal *et al*, 2013).

Uma boa vacina é segura e administrada de uma maneira minimamente invasiva, tendo a capacidade de induzir uma resposta imunológica protectora (Bal *et al*, 2010b). As vacinas actualmente disponíveis podem ser classificadas em três categorias, designadamente, vivas-atenuadas, inactivas e sub-unitárias. Sob o ponto de vista da segurança as vacinas sub-unitárias são preferidas em relação às vacinas vivas-atenuadas ou de patogéneos inactivos. Contudo, os antigénios purificados geralmente são menos imunogénicos e requerem a sua formulação com adjuvantes (Schijns, 2000; Wilson-Welder *et al*, 2009).

A maioria das vacinas administradas por injeção são eficazes, mas os problemas permanecem uma vez que são dolorosas, necessitando de pessoal especializado bem como de transporte e armazenamento específico (Li *et al*, 2011).

Além de dolorosa, a injeção pode causar *stress*, especialmente nas crianças o que para programas de vacinação pediátrica faz com que a vacinação seja incompleta, devido à falta de cooperação (Jacobson *et al*, 2001). A reutilização das agulhas torna-se também

um problema, uma vez que causa a morte de pelo menos 1,3 milhões de pessoas por ano de hepatite B e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Miller e Pisani, 1999).

A maioria das vacinas sub-unitárias são administradas por injeção intramuscular ou subcutânea, mas vias alternativas como a via nasal (Slutter *et al*, 2008), transcutânea (Mikszta e Laurent, 2008), oral (Simerska *et al*, 2009) e pulmonar (Lu e Hickey, 2007) têm sido exploradas na pesquisa de vacinas mais eficazes, seguras e sem necessidade de agulha (Bal *et al*, 2010b).

### **i. Pele como órgão imunológico**

A via transcutânea é particularmente atractiva, uma vez que a pele é bastante acessível e apresenta características imunológicas únicas (Henderson *et al*, 2008).

Além da função de barreira física, a pele também funciona como barreira imunológica devido à presença de células imunocompetentes como as LCs, os queratinócitos, as dDCs, os macrófagos, os mastócitos e as células-T (Mathers e Larregina, 2006; Nestle e Nickoloff, 2007). Os queratinócitos correspondem a cerca de 90% da população celular epidérmica e apresentam um papel importante na imunidade inata através da produção de uma vasta gama de citocinas e péptidos antimicrobianos. As LCs na epiderme e as dDCs desempenham papéis importantes como potentes APCs contra antigénios externos (Hirobe *et al*, 2013). Assim, o músculo e o tecido subcutâneo, que contêm menor quantidade de APCs do que o tecido da pele, fazem com que não sejam sítios ideais para a vacinação (Bal *et al*, 2010b). Contudo, o EC actua como barreira para a difusão criando o maior obstáculo para a imunização transcutânea (*Transcutaneous Immunization - TCI*), nomeadamente na vacinação com a pele intacta ou pré-tratada (Bal *et al*, 2010b).

A pele está então envolvida na imunidade inata e adaptativa. A resposta adaptativa gera respostas memória e portanto, torna-se geralmente mais eficaz contra cada encontro sucessivo com o mesmo antigénio, enquanto o mecanismo da resposta imune inata fornece uma defesa imediata mas de curta duração contra infecções (Bal *et al*, 2010b).

Actualmente, os principais desafios para a imunização cutânea são aumentar o transporte de antigénios pela barreira da pele e melhorar a imunogenicidade das vacinas sub-unitárias para aplicação tópica (Bal *et al*, 2010b). Para as vacinas sub-unitárias é

requerida a co-aplicação de adjuvantes juntamente com os antígenos para que haja a indução de uma resposta imune. Esta abordagem também é válida para a TCI, mas para que haja um transporte com sucesso do antígeno e adjuvantes pela pele, existe um maior desafio (Bal *et al*, 2010b).

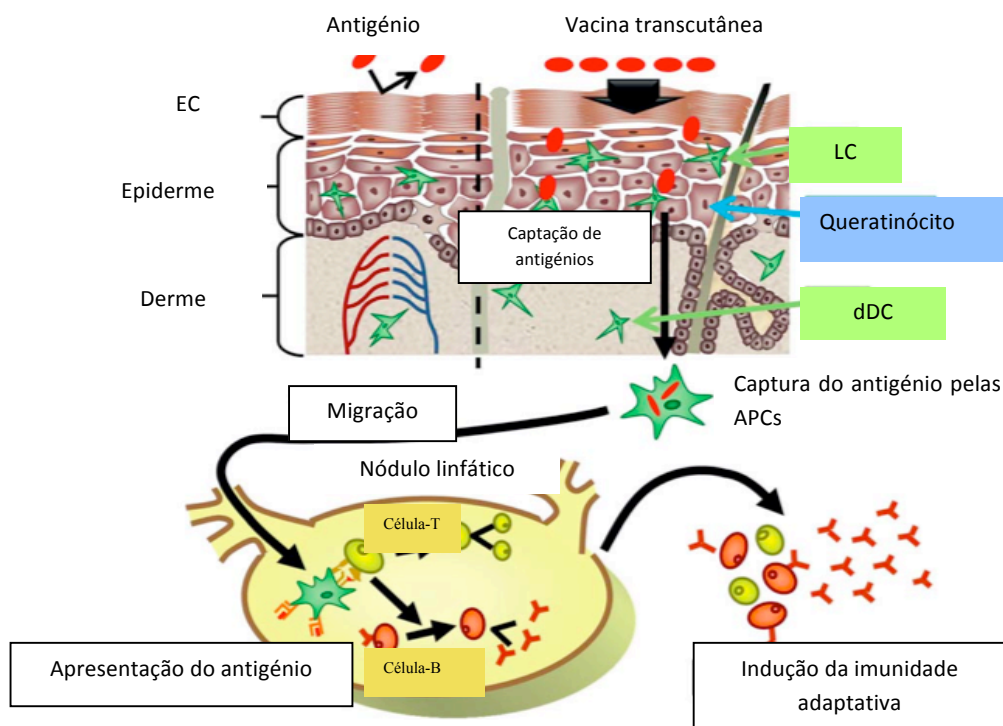
A TCI é um novo método de vacinação que utiliza a aplicação tópica do antígeno e de um adjuvante na pele intacta, de forma a induzir uma resposta imune (Hammond *et al*, 2000).

A vacina transcutânea, como sistema fácil de usar, sem agulha e não invasivo possibilita a estimulação imunológica segura, uma vez que se evita o contacto directo dos adjuvantes com a corrente sanguínea (Ponvert e Scheinmann, 2003), apresentando uma rápida distribuição, auto-administração e maior segurança (Bal *et al*, 2010b; Glenn *et al*, 1999).

## **ii. Mecanismo de acção da imunização transcutânea**

Na TCI as LCs e as dDCs capturam antígenos/agentes patogénicos, e migram para os gânglios linfáticos periféricos que processam e apresentam o antígeno às células-T imaturas, que por sua vez, vão iniciar as respostas imunes (Hammond *et al*, 2001; Hirobe *et al*, 2013) (Figura 5).

A indução da resposta imune origina a secreção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas envolvidas no processo de TCI incluem, receptores para muitos anticorpos, integrinas e moléculas de adesão (Schwarzenberger e Udey, 1996). As citocinas têm como função, a migração das LCs desde a pele até aos nódulos linfáticos. Mais especificamente, as quimiocinas são importantes no controlo na migração direccional das LCs até aos nódulos linfáticos, posicionando-as na área das células-T. Depois da apresentação do antígeno pelas APCs, muitas citocinas podem ser secretadas em termos de imunidade adaptativa. A interacção destas citocinas com LCs e as dDCs ajudam a manter um balanço entre a reactividade e a tolerância do sistema imunitário (Wang *et al*, 1999).



**Figura 5** – Representação esquemática do mecanismo de indução da resposta imune através da imunização transcutânea. EC – estrato córneo; LC – células de Langerhans; dDC – células dendríticas dérmicas, APCs – células apresentadoras de antígeno. (adaptada de Hirobe *et al*, 2013).

### iii. Adjuvantes da imunização transcutânea

Os adjuvantes são adicionados às formulações de vacinas para aumentar a imunogenicidade de antígenos pouco imunogênicos, como nas vacinas sub-unitárias, ou para se obter uma determinada resposta imune. Pelas mesmas razões, formulações de vacinas particuladas devem ser combinadas com adjuvantes (Mittal *et al*, 2013).

Há que ter em consideração o risco de possíveis efeitos secundários dos adjuvantes, que tem elevada relevância para vacinas profiláticas, uma vez que são dadas a pessoas saudáveis e têm que satisfazer fortes critérios de segurança (Mittal *et al*, 2013).

Em imunologia, os adjuvantes são agentes que estimulam o sistema imunitário e aumentam a resposta à vacinação, contudo não têm nenhuma acção antigénica específica. A combinação de adjuvantes e vacinas de antígeno-específicas conseguem acelerar, prolongar ou aperfeiçoar as suas respostas (van der Laan, 2005).

Nem todos os adjuvantes fazem efeito na TCI devido ao seu grande tamanho que não permite a penetração na pele. Os adjuvantes que demonstram eficácia na TCI podem ser divididos em exotoxinas bacterianas (em que as subunidades das toxinas são responsáveis pela expressão de diferentes citocinas) e receptores tipo-toll (*Toll-Like Receptors* – TLR) (que são moléculas responsáveis pelo reconhecimento do perigo para as células). (Williams, 2000;Seya *et al*, 2006) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Tabela representativa dos adjuvantes imunológicos usados na imunização transcutânea APCs – Células apresentadoras de antigénio; CpG ODN – CpG oligonucleótidos CT – *Vibrio cholerae*, toxina da cólera; CT-B – subunidade B da toxina da cólera; IFN – interferão; IL – interleucina; LPS – lipopolissacarídeo; LT – enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*; LT-B – subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*; TNF – factor de necrose tumoral. (adaptada de Li *et al*, 2011).

Adjuvantes transcutâneos	Tipo/ Fonte	Função na TCI	Secreção de citocinas
CT, CT-B	<i>Vibrio cholerae</i> , toxina da cólera e as suas subunidades	Aumenta o número de LCs na epiderme; induz a resposta de anticorpos contra a toxina e os antígenos administrados.	Produz IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$
LT, LT-B	Enterotoxina termolábil e suas subunidades da <i>Escherichia coli</i>	Molécula com uma estrutura e actividade à CT.	Produz IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$
LPS	Membrana externa de bactérias Gram-negativas	Indução da migração das LCs; aumenta a activação das células T; melhora a força e a duração das respostas imunes.	Estimula as células hospedeiras a produzir IL e TNF
CpG ODN	DNA bacteriano e oligodesoxinucleotídeos	Promove a imunogenicidade da vacina, melhorando a duração e afinidade da resposta imune.	Produz IFN- $\gamma$ e citocinas pró-inflamatórias; promove a maturação/activação das APCs
Imiquimod	3-(2-Metilpropil)-3,5,8-triazatriciclo[7.4.0.02,6]trideca1(), 2(&),4,7,10,12-hexaen-7-amina)	Indução da migração das LCs; modifica as respostas imunes com efeitos anti-virais e anti-tumorais.	Indutor potente de IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ E IL-1,6,8,10,12

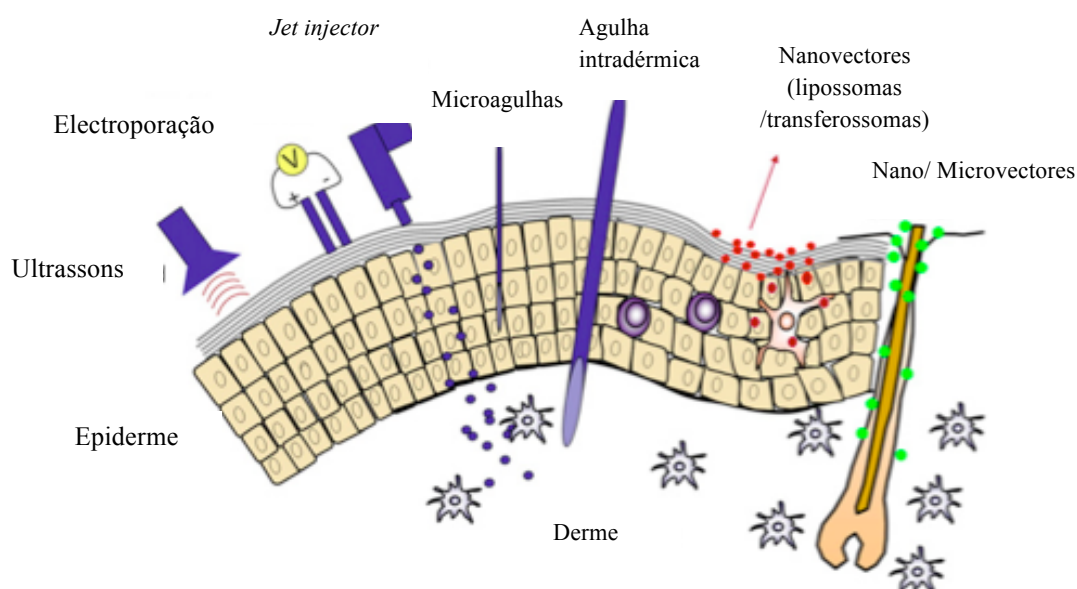
### A. Promotores Físicos

A ruptura da barreira da pele aumenta a permeação transcutânea do antigénio, tornando-o mais rapidamente disponível para o apresentar às APCs. Além disso, é sabido que a disrupção da barreira da pele consegue activar o sistema imunitário, induzindo a

secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos resultando numa activação de dDCs (Wood *et al*, 1992;Cumberbatch *et al*, 1997). Assim, torna-se atractivo desenvolver métodos físicos que permitam atravessar a barreira da pele (Bal *et al*, 2010b).

Muitos estudos mostraram que apenas a aplicação tópica da vacina, não era capaz de promover uma resposta imune adequada. Então, técnicas físicas como a iontoforese, electroporação e ultrassons têm sido investigados de forma a melhorar a penetração do antigénio pelo EC (Li *et al*, 2011).

Verifica-se que muitos factores, como a força iónica, o pH e a temperatura influenciam significativamente a permeabilidade transcutânea (Chen *et al*, 2002).



**Figura 6** – Representação esquemática de vários processos físicos e sistemas, desenvolvidos para a imunização transcutânea (adaptada de Bal *et al*, 2010b).

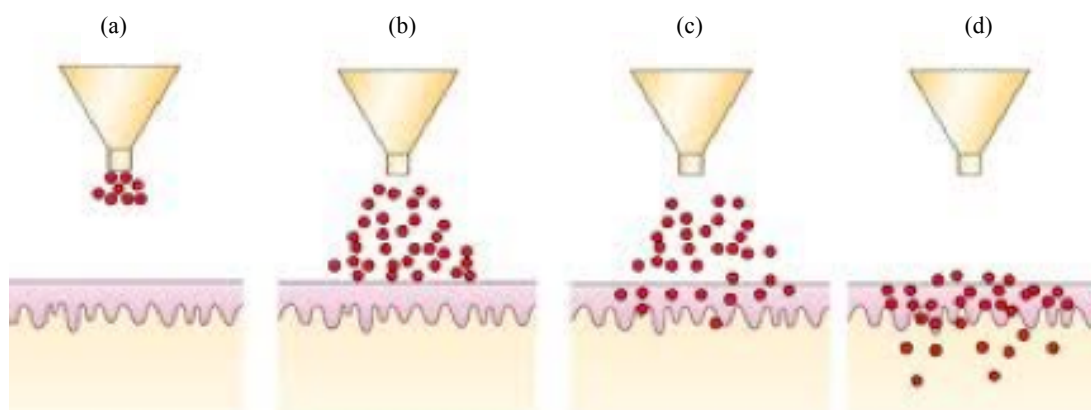
a. Ultrassons

Os ultrassons de baixa frequência aumentam a permeação da pele para moléculas grandes permitindo a vacinação transcutânea. A TCI por ultrassons oferece uma imunização sem agulha e sem dor (Dahlan *et al*, 2009b).

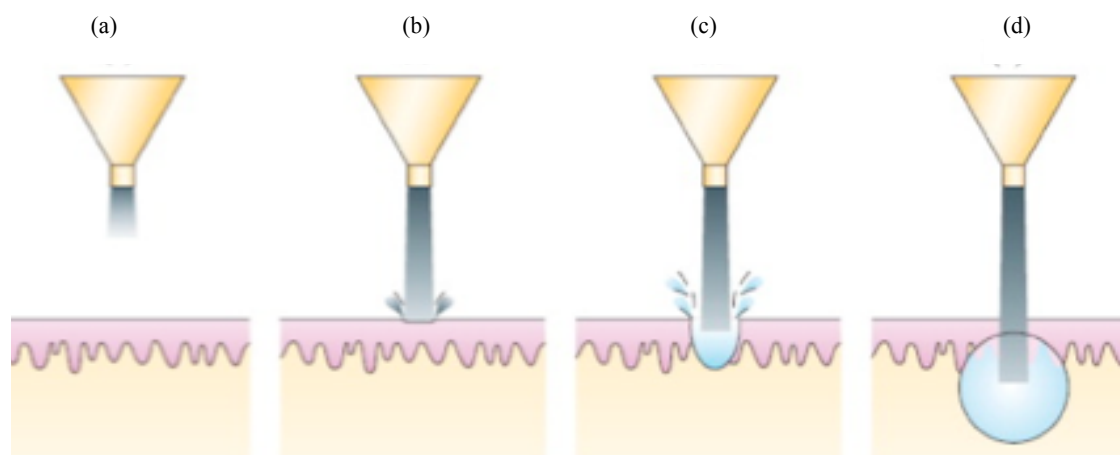
Dahlan *et al.* (Dahlan *et al.*, 2009b) demonstrou que os ultrassons de baixa-frequência aumentam o nível de anticorpos na TCI. O uso deste tipo de ultrassons pode ser definido como um potente adjuvante físico para a TCI, uma vez que há uma ligeira activação das LCs depois da passagem dos ultrassons mesmo sem presença de antigénio (Tezel *et al.*, 2005). A aplicação, na pele, dos ultrassons de baixa frequência extrai lipídeos, causando a formação de defeitos e espaços lacunares, criando regiões de elevada permeabilidade para o transporte na pele. Assim, a aplicação de lipossomas na pele depois do uso de ultrassons, permite o fluxo do complexo lipossoma/antigénio para a pele e conseqüentemente leva à TCI. A aplicação dos lipossomas repara o dano causado pelos ultrassons, sugerindo assim que há um efeito sinérgico entre os lipossomas e a TCI por ultrassons. Contudo, a vacinação por ultrassons requer o uso de equipamento bastante especializado (Dahlan *et al.*, 2009a) (Figura 10A).

*b. Jet injector*

O *jet injector* faz a cedência de antigénios em pó (Figura 7) ou em forma líquida (Figura 8) para a pele através de hélio pressurizado (Macklin *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2008). Este dispositivo impulsiona partículas micrométricas revestidas com o plasmídeo através do EC onde as partículas se alojam na epiderme e derme (Li *et al.*, 2011).



**Figura 7** - Representação esquemática da administração transcutânea através do *jet injector* de partículas sólidas. (a) ejeção de partículas através do bocal, (b) partículas colidem com a superfície da pele, conduzindo à formação de um orifício, (c) penetração das partículas no estrato córneo, (d) as partículas são distribuídas para camadas mais profundas da pele (adaptada de Kale e Momin, 2014).



**Figura 8** - Representação esquemática da administração transcutânea através do *jet injector* de formas líquidas. (a) formação do jacto líquido, (b) formação de um orifício na pele devido ao impacto do jacto, (c) avanço da injeção ao longo das camadas cutâneas, (d) deposição das substância em camadas mais profunda da pele (adaptada de Kale e Momin, 2014).

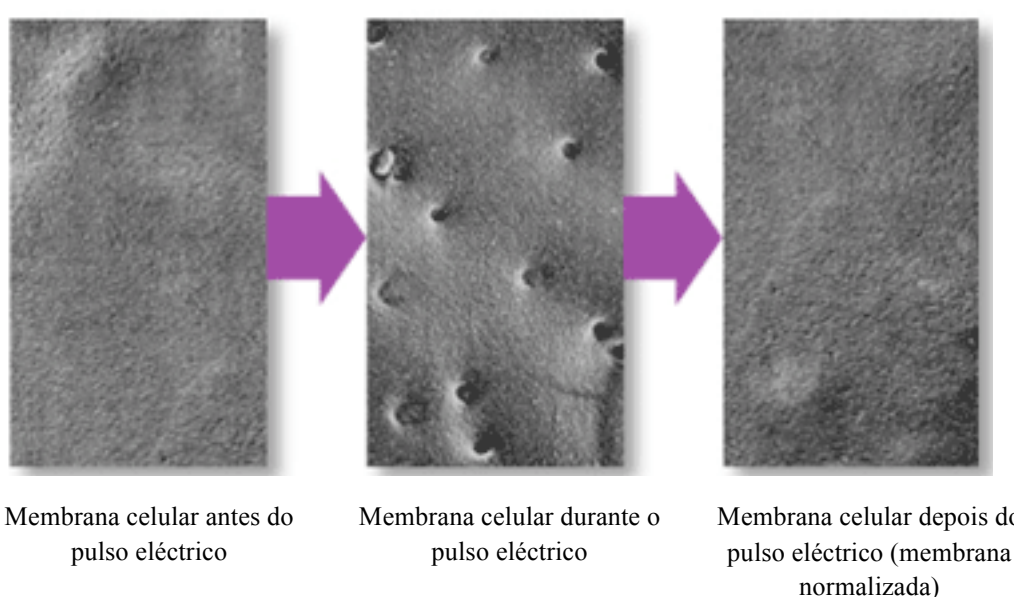
Esta técnica tem sido investigada em diferentes animais contra uma variedade de doenças, incluindo influenza, hepatite B, marburgo, malária, ébola e alguns vírus provocadores de encefalites. Huang *et al.* usou o *jet injector* de baixa pressão para fazer chegar nanopartículas à pele. Como resultado, as nanopartículas foram capazes de transcutaneamente fazer chegar o antígeno até aos locais alvo e induzir uma resposta com pouca lesão celular (Huang *et al.*, 2009).

A disrupção da pele com este sistema causa efeitos secundários ligeiros como queimadura no sítio de aplicação, mas que se resolve em horas (Drape *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2009). É um método com pouca prevalência devido à forte dor (Hirobe *et al.*, 2013) (Figura 10C).

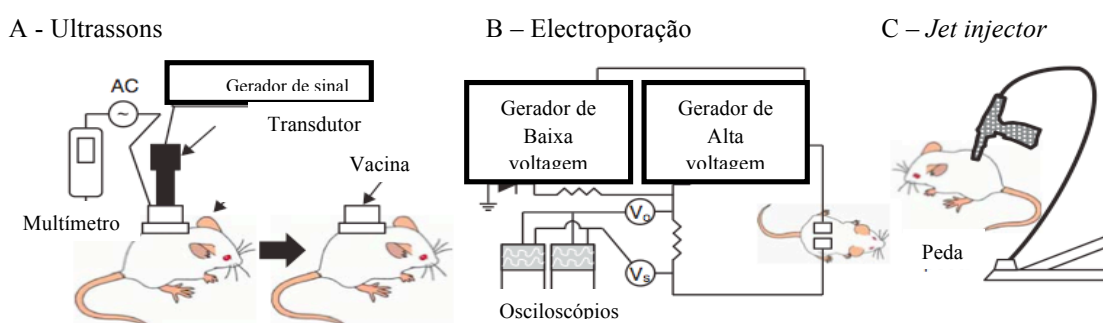
### c. Electroporação

É sabido que o maior transporte molecular através da pele é resultante dos rearranjos estruturais da membrana celular (Weaver, 1995). A electroporação é uma perturbação estrutural transitória da bicamada lipídica, incluindo o EC através de pulsos elétricos de alta voltagem, curtos e controlados, no tecido-alvo (Vanbever *et al.*, 1994) (Figura 9).

Comparativamente com a injeção intradérmica, a electroporação é menos invasiva devido à disponibilidade de sondas não invasivas. O fármaco pré-foto sensibilizador, ácido delta-aminolevulínico, o fármaco anticancerígeno metotrexato e as vacinas peptídicas desenhadas para prevenção do cancro e imunoterapia, foram administradas transcutaneamente através da electroporação (Sen *et al*, 2002). Estes estudos demonstraram que a electroporação aplicada na TCI é promissora para a terapia no cancro (Li *et al*, 2011). Assim como a técnica dos ultrassons, a electroporação também requer aparelhos especiais (Hirobe *et al*, 2013) (Figura 10B).



**Figura 9** - Imagem microscópica do rearranjo estrutural da membrana celular pelo método de electroporação (adaptada de <http://gmcrops.yolasite.com/methods-of-genetic-engineering>).



**Figura 10** – Representação esquemática de aparelhos para vacinação (adaptada de Hirobe *et al*, 2013).

#### d. Microagulhas

Uma nova abordagem para a TCI menos dolorosa é a redução do tamanho das agulhas para que sejam minimamente perceptíveis. O conceito das microagulhas como vectores de fármacos, resultou de uma patente registada em 1976 por Gerstel e Place (Alarcon *et al*, 2007). Contudo, foi só nos anos 90 que esta técnica se tornou viável, uma vez que as técnicas de fabricação se tornaram disponíveis para produzir estas microagulhas (Hirobe *et al*, 2013). Neste contexto, o termo microagulha refere-se a agulhas menores que 1 mm precisando apenas de perfurar 15 a 20  $\mu\text{m}$  da espessura do EC antes de chegar à epiderme viável (Hirobe *et al*, 2013).

As propriedades mecânicas e estruturais da pele variam significativamente com a idade, tipo de pele, nível de hidratação, localização no corpo e entre indivíduos (Reihnsner *et al*, 1995). De forma a garantir uma perfuração eficaz e reprodutível independentemente destes factores, as microagulhas precisam de ser maiores que 20  $\mu\text{m}$  (Widera *et al*, 2006). Outros parâmetros, como o diâmetro da microagulha, a profundidade da inserção, o tipo de geometria e a densidade, também influenciam a perfuração na pele, bem como a distribuição do antigénio (Widera *et al*, 2006; Martanto *et al*, 2006). Por exemplo, as microagulhas muito finas são frágeis, o que aumenta o risco de fractura na pele (Davis *et al*, 2004). Por outro lado, o aumento da densidade das microagulhas pode aumentar o efeito “cama de unhas” não melhorando a distribuição do antigénio (Widera *et al*, 2006).

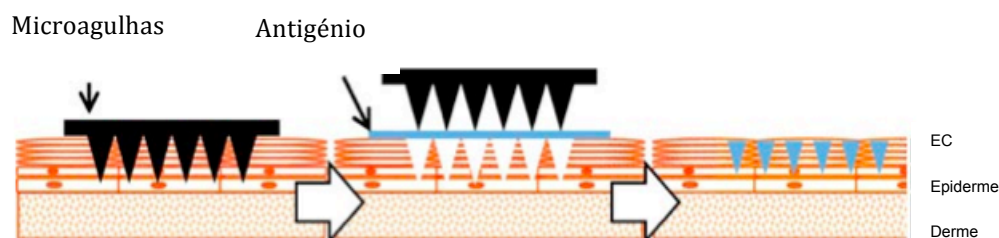
Muitas estratégias usando as microagulhas foram desenvolvidas para aplicação dérmica, incluindo a TCI (Donnelly *et al*, 2010; Prausnitz *et al*, 2009). Uma vez que, é um método fácil de usar existem diferentes abordagens (Hirobe *et al*, 2013) sumarizadas de seguida.

#### Microagulhas sólidas

O primeiro método envolve a perfuração da pele com microagulhas sólidas e aplicação dos antigénios na superfície da pele (Hirobe *et al*, 2013) (Figura 11).

Na avaliação da eficácia da TCI, o pré-tratamento da pele usando o mesmo tipo de microagulhas levou a um aumento de mil vezes o nível de anticorpos, depois da aplicação do toxóide da difteria em ratos (Ding *et al*, 2009b). A resposta imune foi

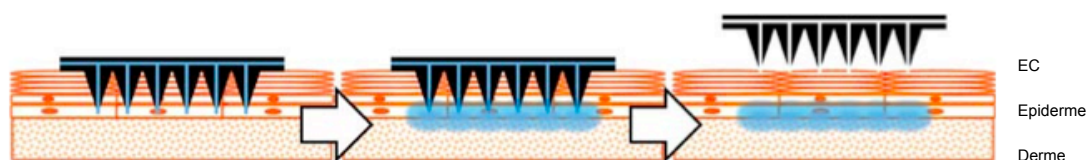
aumentada pela co-aplicação da toxina da cólera, mostrando que a adição selectiva de adjuvantes pode diminuir a dose de antigénio necessária (Ding *et al*, 2009a). Em geral, o pré- ou pós-tratamento com as microagulhas é considerado uma abordagem simples para a TCI com grande potencial, embora parâmetros como dose e tempo de aplicação devam ser optimizados (Hirobe *et al*, 2013).



**Figura 11** – Representação esquemática da imunização transcutânea recorrendo a microagulhas sólidas. A distribuição do antigénio é feita através das fendas criadas através das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe *et al*, 2013).

#### Microagulhas ocas

Durante o pré-tratamento com microagulhas sólidas, a distribuição do antigénio é dependente da difusão passiva através de condutas criadas pelas microagulhas. Apesar de ser uma abordagem relativamente fácil do ponto de vista técnico, é difícil optimizar a quantidade de antigénio requerida para activar as células imunes na pele, devido ao limite de transporte pelas condutas. As microagulhas ocas conseguem injectar a vacina para uma profundidade bem definida na pele, orientando a taxa de fluxo através de uma seringa ou uma bomba (Hirobe *et al*, 2013). Estas microagulhas são feitas de vários materiais, como silicone, metal ou vidro (McAllister *et al*, 2003) (Figura 12).

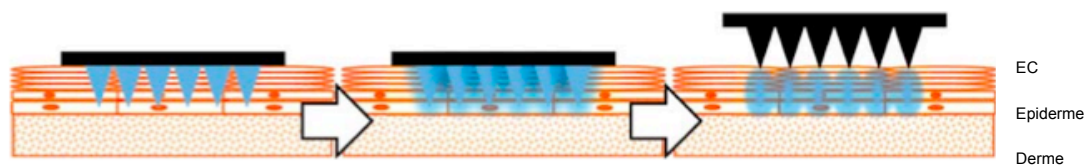


**Figura 12** – Representação esquemática da imunização transcutânea recorrendo a microagulhas ocas. O antigénio entra na pele através das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe *et al*, 2013).

### Microagulhas revestidas

O revestimento é normalmente aplicado através do mergulho das microagulhas na formulação da vacina (Gill e Prausnitz, 2007a;Zhu *et al*, 2009). Outro método utilizado é o revestimento através de um jacto de gás de forma a conseguir um revestimento mais uniforme (Chen *et al*, 2009).

Este tipo de microagulhas pode não ser muito atractivo, uma vez que a quantidade de compostos activos que podem ser revestidos é limitada. Contudo, esta quantidade pode ser suficiente para que antigénios possam promover uma resposta imune protectora. Adicionalmente uma das vantagens destas microagulhas é que o antigénio seco adere à sua superfície melhorando a estabilidade a longo prazo (Gill e Prausnitz, 2007b) (Figura 13).



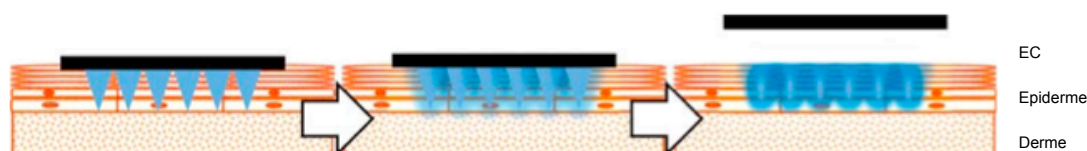
**Figura 13** – Representação esquemática da imunização transcutânea recorrendo a microagulhas revestidas. O antigénio difunde-se na pele através das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe *et al*, 2013).

### Microagulhas absorvíveis

As microagulhas convencionais correm o risco de fractura, o que pode deixar metais como o aço inoxidável ou fragmentos de silicone na pele. O uso de materiais biodegradáveis ou absorvíveis contendo componentes de vacinas é uma maneira elegante de distribuir a vacina, sem a possibilidade de quebra das microagulhas na pele. Além disso, este tipo de sistemas não deixam resíduos médicos de risco biológico e removem o risco de infecções secundárias devido ao uso de agulhas (Hirobe *et al*, 2013).

As primeiras microagulhas foram feitas de maltose (Miyano *et al*, 2005) e mais tarde, desenvolveram-se microagulhas de dextrinas para o transporte de insulina e eritropoetina (Ito *et al*, 2006a;Ito *et al*, 2006b).

Sullivan *et al.* mostrou que a imunização com microagulhas absorvíveis poliméricas contendo o vírus influenza inativado, induziu uma resposta antigénica e celular forte promovendo protecção contra este vírus (Sullivan *et al.*, 2010) (Figura 14).



**Figura 14** – Representação esquemática de microagulhas absorvíveis. O antígeno entra na pele através da dissolução das microagulhas. EC – Estrato córneo. (adaptada de Hirobe *et al.*, 2013).

#### e. Laser

A aplicação de lasers para propósitos terapêuticos foi demonstrada como uma tecnologia promissora para o aperfeiçoamento da TCI. O laser pode ser um adjuvante seguro impulsionando respostas imunes tanto humorais como inatas, com poucos efeitos secundários. A iluminação laser específica aumenta a mobilidade e a capacidade de captura das APCs, sem que ocorra inflamação ou reactividade (Chen *et al.*, 2010).

O tratamento laser sem nenhum adjuvante ou promotor de penetração aumentou significativamente a produção de anticorpos no soro cerca de três vezes (Li *et al.*, 2011).

#### iv. Novas Formulações

Não é fácil para grandes proteínas e partículas virais penetrarem pelo EC em condições naturais. O maior desafio para a TCI é aperfeiçoar a passagem dos antígenos pela epiderme. É sabido que a disrupção da barreira da pele aumenta a permeação transcutânea do antígeno tornando-o mais rapidamente pronto para ser apresentada às APCs. Contudo, tecnologias “sem-agulha”, que são capazes de promover a disrupção da barreira epidérmica da pele têm sido altamente investigadas, de forma a activar o sistema imune e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos queratinócitos (Li *et al.*, 2011).

Actualmente tem-se focado a investigação em micro/nanovectores de fármacos, como lipossomas, e nanopartículas para a formulação de vacinas transcutâneas, com o objectivo de aperfeiçoar o transporte transcutâneo, bem como na protecção da degradação do antigénio (Li *et al*, 2011).

#### A. *Patch*

É um dos sistemas mais usados para as vacinas transcutâneas. A vacinação em *patch* demonstrou a promoção da penetração de proteínas antigénicas através do EC e a indução de respostas imunes humorais antigénio-específicas, que neutralizam as infecções virais e toxinas bacterianas de maneira segura (Matsuo *et al*, 2011).

O mecanismo deste tipo de sistemas é baseado na concentração de proteínas antigénicas na superfície do *patch* gerando uma maior concentração, que conseqüentemente produz uma força acelerando a penetração das substâncias. Uma resposta imune prolongada e um efeito intensificador foi induzido, indicando que a memória imune consegue ser obtida por este tipo de vacinas (Matsuo *et al*, 2011).

Foi mostrado por Ding *et al*. que a TCI baseada em *patch* consegue induzir respostas imunes eficazes contra infecções virais e bacterianas (Ding *et al*, 2011).

#### B. Nanopartículas

Recentemente, as nanopartículas mostraram ser vectores promissores para as vacinas transcutâneas, devido à interacção com os lipídeos da pele e a conseqüente indução de aberturas transitórias e reversíveis no EC (Kohli e Alpar, 2004). Foi provado que a encapsulação dos antigénios em nanopartículas é eficaz no transporte transcutâneo. Adicionalmente as vacinas nanoparticuladas também conseguem penetrar pelos folículos pilosos e transportar o antigénio às APCs melhorando a resposta imune (Vogt *et al*, 2006; Kohli e Alpar, 2004). Recentemente têm sido referenciados vários polímeros para preparação de nanopartículas capazes de carregar antigénios e iniciar uma forte TCI (Li *et al*, 2011).

a. Nanopartículas poliméricas de Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) e Ácido poli(láctico)

As nanopartículas de ácido poli(láctico) (*Poly(lactic acid)* – PLA) e Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (*Poly (lactic-co-glycolic acid)* – PLGA) mais comumente usadas têm sido extensamente estudadas como vetores transcutâneos de antígenos (Panyam e Labhasetwar, 2003).

George Mattheolabakis *et al.* (Mattheolabakis *et al.*, 2010) examinaram o potencial das partículas de PLA como vetores para a entrega de antígenos via transcutânea. Usando um processo de dupla emulsão, as nanopartículas de PLA carregadas com ovalbumina (*Ovalbumin* – OVA) demonstraram uma indução de citocinas eficiente. A re-estimulação *in vitro* de culturas de esplenócitos com OVA suscitou maiores níveis de interferon gama (*Interferon- $\gamma$*  – IFN- $\gamma$ ) assim como maiores níveis de interleucina-2 (IL-2) em ratos, em comparação com outros imunizados com uma solução de OVA (Li *et al.*, 2011).

b. Nanopartículas biodegradáveis de quitosano

O quitosano, pela sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade assim como pela sua preparação é um material biomimético para o desenvolvimento de vetores de fármacos (Nagpal *et al.*, 2010;Prego *et al.*, 2010). O quitosano interage com as cargas negativas da pele, promovendo a difusão de fármacos para as suas camadas mais profundas (Taveira *et al.*, 2009).

As propriedades do quitosano e seus derivados são promissoras na aplicação da TCI, uma vez que as nanopartículas de quitosano funcionam como promotoras imunitárias na TCI (Lee *et al.*, 2008). É aceite que a protecção da degradação do antígeno pela sua conjugação com o polímero seja vantajoso para potenciar a resposta imune. Contudo, não se consegue explicar o porquê das nanopartículas de quitosano levarem a uma resposta imune maior do que a injeção intramuscular (IM) (Slutter *et al.*, 2009). Assim, as nanopartículas de quitosano actuam como adjuvantes (Bal *et al.*, 2011) funcionando também como depósito sendo mais eficientemente apresentadas às células dendríticas do que os antígenos simples (Bal *et al.*, 2010c;Bal *et al.*, 2010a).

c. Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas de tamanho menor que 10 nm, incluindo pontos quânticos e nanopartículas de óxido de ferro, revelaram ser capazes de penetrar através da pele intacta devido à sua interação com os lipídeos no espaço extracelular. Huang *et al.* demonstrou que a co-administração de proteínas com nanopartículas de ouro (*Gold (Au) Nanoparticles* – Au-NPs) permitiu o transporte percutâneo. As Au-NPs com 5 nm de tamanho demonstraram ser permeáveis à pele (Huang *et al.*, 2010).

Utilizando este método, um sistema não invasivo de vacinas foi desenvolvido, e as respostas imunes foram provocadas em animais através da aplicação tópica e simultânea de antígenos com Au-NPs (Li *et al.*, 2011).

d. Outras nanopartículas

Madsen *et al.* projectaram compostos imunoestimulantes (*Immune Stimulating Complexes* – ISCOMs) modificados chamados de nanopartículas Posintro™, e investigou a interação entre os ISCOMs modificados e os sistemas lipídicos, modelo do estrato córneo. As nanopartículas Posintro™ demonstraram ser vantajosas, criando uma oportunidade para alterar a carga à superfície das partículas, que vai influenciar a sua afinidade para os locais negativos do antígeno, as membranas celulares e lipídeos da pele (Madsen *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2009).

Estas características são úteis na estimulação da fusão das nanopartículas modificadas com a pele promovendo a sua penetração (Li *et al.*, 2011).

**C. Nanovectores vesiculares**

É sabido que o EC impede a penetração de moléculas grandes bem como moléculas hidrofílicas. Os novos sistemas vesiculares de transporte de fármacos chamados transferossomas são compostos por fosfolipídeos (Jain *et al.*, 2003) tendo uma estrutura semelhante às membranas biológicas. Os transferossomas incluem: lipossomas deformáveis e niossomas que foram formulados para a aplicação tópica/transdérmica transportando compostos bioactivos, como antibióticos, proteínas e ácidos nucleicos para a pele. O transporte transcutâneo de proteínas aumenta através de transferossomas (Paul *et al.*, 1998).

a. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas de lipídeos que representam vectores de fármacos e moléculas biologicamente activas. As vesículas lipídicas dos lipossomas, especialmente lipossomas elásticos, podem modificar a cinética de permeação de bioactivos devido à debilitação da função do EC, o que vai ajudar na penetração da pele. Os lipossomas geralmente contém fosfatidilcolina e tensioactivos e apresentam pelo menos um compartimento aquoso envolto numa bicamada lipídica capaz de carregar uma grande quantidade de massa lipídica na pele. A sua bicamada flexível pode mexer com os lipídeos do EC, desordenando a função de barreira e aumentando a disposição dos fármacos na pele. Mishra *et al.* estudaram que a superfície do antigénio da hepatite B carregado em lipossomas elásticos era uma maneira eficaz para promover a imunidade contra o antigénio (Mishra *et al*, 2006). Wang *et al* preparou lipossomas catiónicos deformáveis para a TCI, que suscitaram valores comparáveis de anticorpos no soro, assim como citocinas endógenas com uma imunização de referência IM (Koutsonanos *et al*, 2009).

b. Niossomas

Os niossomas possuem as vantagens de baixo custo, elevada pureza, uniformidade de conteúdo, estabilidade sustentada, assim como facilidade de armazenamento de tensioactivos não iónicos. Estes nanovectores parecem ser semelhantes em termos de propriedades físicas aos lipossomas, sendo preparados da mesma maneira e sob uma variedade de condições formando estruturas unilamelares ou multilamelares (Vyas *et al*, 2005). Os niossomas têm sido aplicados na TCI não invasiva (Ding *et al*, 2008). As estruturas vesiculares dos niossomas são observadas em camadas mais profundas do EC perto da junção do estrato córneo-epiderme viável depois da aplicação não-oclusiva na pele (Li *et al*, 2011).

**D. Microemulsões**

As microemulsões são vectores coloidais que oferecem várias vantagens para a veiculação de fármacos, assim como fácil preparação, estabilidade a longo-prazo e elevada capacidade de solubilização para agentes hidrófilos e lipófilos (Heuschkel *et al*, 2008; Sintov e Botner, 2006). Contudo, ainda não foram vastamente investigadas para a aplicação nas vacinas transcutâneas. As microemulsões especialmente as do tipo

água/óleo mostraram um grande potencial na absorção e distribuição de macromoléculas solúveis em água, assim como péptidos (Cui *et al*, 2003), devido às suas propriedades de penetração no EC (Naoui *et al*, 2011;Cui e Sloat, 2006).

Os sistemas de microemulsão são fáceis de preparar e podem facilmente acomodar vários antígenos e adjuvantes. Estes sistemas também oferecem elevada eficácia de retenção com estabilidade otimizada, proporcionando uma protecção contra a degradação de proteínas carregadas (Cui e Sloat, 2006).

#### E. Outras formulações

Su *et al*. (Su *et al*, 2009) estudaram um novo filme multilamelar no qual proteínas e oligonucleótidos hidroliticamente degradáveis foram incorporadas para transporte transcutâneo. Os resultados mostraram que a OVA carregada em filmes LbL (*layer-by-layer*) penetraram na pele com disrupção, sendo capturadas pelas APCs da pele e transportadas para os nódulos linfáticos da pele. Outro estudo mostrou uma membrana não tecido de nanofibras com o antígeno de protecção. Esta membrana contendo o antígeno de protecção é produzida através do processo de *electrospinning*. Esta nova formulação fornece a base para a vacina transdérmica de antraz (Knockenhauer *et al*, 2008).

Por aplicação de uma nanodispersão de sólidos em óleo, Tahara *et al*. alcançaram uma TCI sem pré-tratamento da pele e sem uso de adjuvantes (Tahara *et al*, 2010). A nanodispersão oleosa de fármacos hidrófilos promoveu a permeação de proteínas pela pele (Li *et al*, 2011).

## 2. Doenças do foro reumatológico

### i. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma desordem auto-imune, crónica, destrutiva, inflamatória e sistémica da membrana sinovial que leva a danos localizados nas cartilagens articulares, ossos, tendões e ligamentos, seguido da perda de função (Firestein, 2003).

A prevalência estimada da AR é maior do que 0,5-1% da população mundial (Lawrence *et al*, 1998) aumentando com a idade. Ocorre entre os 40-70 anos de idade, sendo as mulheres duas a três vezes mais susceptíveis à AR que os homens (Firestein, 2003).

A AR tem uma importância socioeconómica considerável, uma vez que é a maior causa de incapacidade e limitações no trabalho, bem como factor de risco de acidentes (Centers for Disease e Prevention, 2001). É comumente considerada uma doença não fatal, contudo em adultos é relacionada com complicações sérias como doenças cardiovasculares e infecções, levando ao aumento da mortalidade e à redução de 5 a 10 anos da esperança média de vida (Centers for Disease e Prevention, 2001; Wolfe *et al*, 1994).

Embora a fisiopatologia da AR permaneça indefinida, nas últimas décadas tem-se testemunhado avanços impressionantes na sua compreensão. Na fase inicial, antigénios externos ou próprios desencadeiam respostas imunes anormais que por sua vez activam a interacção entre as células-B e as células-T produzindo diversos auto-anticorpos como o factor reumatóide e o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico, seguido de activação inflamatória da parte sinovial (Tarner *et al*, 2005). Nas seguintes etapas, a infiltração das células-T CD4+, células-B e macrófagos na parte sinovial, leva ao revestimento sinovial hipertrofiado, chamado de *pannus*, com formação de novos vasos (angiogénese) (Koch, 2003). As células-T CD4+ activadas vão produzir IFN- $\gamma$  e outras citocinas inflamatórias, que inicialmente estimulam os monócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais. Consequentemente, os macrófagos activos e os fibroblastos sinoviais induzem a hiperprodução de citocinas inflamatórias como o factor de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor* – TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-18 (Lee *et al*, 2012). O TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 estimulam os osteoclastos, condrócitos, neutrófilos, e os fibroblastos sinoviais a produzir várias metaloproteínas e enzimas destruidoras de articulações, incluindo a óxido-nítrico sintetase induzida (iNOS) e a

ciclooxigenase-2 (COX-2), nas articulações inflamadas. Por último, estas enzimas medeiam a degradação da cartilagem e a erosão do osso, resultando em dor e destruição da articulação. Em pacientes com AR tratada inadequadamente, a destruição da articulação é irreversível (Choy e Panayi, 2001; Zwerina *et al*, 2005).

Em geral, as terapias correntes da AR são classificadas em anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), glucocorticóides, fármacos modificadores da evolução da doença reumatisal (*Disease-modifying antirheumatic drugs* - DMARDs) e fármacos biológicos. Estes fármacos podem ser usados sozinhos ou em combinação dependendo do estado da doença e da adesão do paciente. Uma vez que a AR é uma doença auto-imune que não tem cura, são requeridos tratamentos contínuos. O tratamento frequente e a longo prazo pode causar efeitos secundários sistémicos indesejados e complicações como infecções que reduzem a adesão dos pacientes (Mitragotri e Yoo, 2011).

Para ultrapassar estes problemas, tem-se desenvolvido micro e nanopartículas para vectorização das terapêuticas da AR directamente para a parte sinovial inflamada (Garrod e Pitzalis, 2006). O sucesso das micro e nanopartículas na terapia da AR, depende do seu *design* tendo em conta as propriedades físico-químicas e a actividade farmacológica dos fármacos, assim como da fisiopatologia da AR (Mitragotri e Yoo, 2011).

Uma vez que não há cura para a AR, o primeiro objectivo do tratamento é aliviar a dor e o desconforto minimizando o dano nas articulações, deformações e a perda da função, para que seja mantida uma vida normal e produtiva. As quatro classes de terapias estão actualmente disponíveis e são usadas consoante o grau da inflamação das articulações, o dano articular e o estado da função articular (Mitragotri e Yoo, 2011) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Tabela representativa das opções de tratamento para a artrite reumatóide. AINEs – Anti-inflamatórios não esteróides; DMARDs – fármacos modificadores da evolução da doença reumatismal. (adaptada de Mitragotri e Yoo, 2011).

Classe	Exemplos de fármacos	Modo de acção	Indicações	Risco e efeitos secundários
AINEs	Aspirina, ibuprofeno, naproxeno	Inibição das COXs	Reduz inflamação aguda, diminuindo a dor	Distúrbios gastrointestinais e má função renal.
	Celocoxib	Inibição selectiva da COX-2		Distúrbios gastrointestinais menores.
Corticoesteróides	Prednisona, dexametasona	Prevenção da libertação de fosfolípidos	Anti-inflamatório	Resistência à insulina, diminuição da espessura da pele, osteoporose, hipertensão.
DMARDs	Metotrexato	Actividade anti-metabólica e/ou libertação extracelular de adenosina	Alteração do curso da doença	Cirrose hepática, pneumonia intersticial aguda, mielossupressão.
	Sulfassalazina	Desconhecido		Hipersensibilidade e reacções alérgicas.
	Hidroxicloroquina	Desconhecido		Retinopatia.
	Leflunomida	Actividade anti-metabólica		Cirrose hepática, mielossupressão.
	Sais de ouro	Desconhecido		Reacções de hipersensibilidade, nefrite.
Fármacos Biológicos	Etanercept, infliximab, adalimumab, golimumab	Bloqueio do TNF	Alteração do curso da doença	Infecções (tuberculose).
	Anacinra	Bloqueio do receptor IL-1		Infecções, neutropenia.
	Tocilizumab	Bloqueio do receptor IL-6		Infecções, colesterol elevado.
	Abatacept	Bloqueio da co-estimulação das células-T		Infecções.
	Rituximab	Depleção das células-B		Infecções.

## ii. Tratamento

### A. Anti-inflamatórios não esteróides

Os AINEs têm sido usados para reduzir a dor nos estados iniciais da AR devido ao seu efeito anti-inflamatório, mantendo assim a função da articulação. O mecanismo dos AINEs consiste no bloqueio das COX-1 e COX-2, que geram as prostaglandinas (PGs), que por sua vez têm um papel chave na indução da dor e inflamação. Apesar do seu efeito no alívio da dor, os AINEs não alteram a progressão da doença e o dano articular, sendo mais usados como fármacos aditivos com outros fármacos anti-reumáticos como os DMARDs (Mitragotri e Yoo, 2011).

Contudo, estes fármacos levam a efeitos desfavoráveis no estômago resultantes da inibição das PGs, que têm um papel importante na mucosa gástrica, aquando da administração sistémica. A severidade destes efeitos secundários pode ir desde uma simples doença como dispepsia até uma úlcera e hemorragia gastrointestinal. Além disso, o carácter ácido dos AINEs pode levar a irritação local e lesões na mucosa gastrointestinal. Alguns AINEs são por isso administrados por via percutânea ou transdérmica de forma a atingir efeito local ou sistémico em alternativa à administração parenteral ou oral (Hooper *et al*, 2004).

Na administração dérmica, os fármacos têm que passar o EC para que consigam atingir outras camadas da pele ou para chegar à corrente sanguínea. Desta forma, a formulação apresenta um papel importante para a penetração e absorção dos fármacos (Lee e Maibach, 2006).

As formas farmacêuticas convencionais usadas para a administração dérmica, de forma a atingir efeito local são os geles, cremes e pomadas (Williams, 2003) (Tabela 3). Novos vectores de fármacos estão disponíveis para a administração transdérmica de AINEs. Estas novas abordagens incluem, cristais líquidos, nano/micro emulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas e emplastos. Estes sistemas são usados para promover a passagem cutânea de fármacos para a circulação sistémica e para as diferentes camadas da pele (El Maghraby *et al*, 2008; Guy, 2010; Santos *et al*, 2008).

Diferentes abordagens têm sido realizadas de forma a promover a passagem cutânea dos fármacos com o objectivo de ultrapassar a baixa permeabilidade da pele (Guy, 2010; Trommer e Neubert, 2006). A abordagem mais usada é incluir promotores de penetração nas formulações. Além dos promotores de penetração há estudos disponíveis nos quais métodos físicos, como a iontoforese, são usados de forma a melhorar a distribuição dos fármacos na pele (Guy, 1996; Benson, 2005).

**Tabela 3** – Tabela representativa de formulações dérmicas de anti-inflamatórios não esteróides comercializadas (adaptado de Okyar *et al*, 2012).

AINEs	Tipo de Formulação
Benzidamina	Gel, creme
Felbinac	Gel
Bufexamac	Creme, pomada, loção, emulgel
Diclofenac epolamina	<i>Patch</i>
Diclofenac sódico	Gel, gel spray
Diclofenac potássio	Gel
Diclofenac dietilamónio	Gel, emulgel
Etofenamato	Gel, creme
Ibuprofeno	Gel, creme
Cetoprofeno	Gel
Naproxeno	Gel
Nimesulida	Gel
Piroxicam	Gel
Ácido salicílico	Creme, pomada, loção

#### Abordagem geral e classificação dos anti-inflamatórios não esteróides

Os AINEs são usados para condições crónicas de inflamação como a AR e a osteoartrite, condições pós-traumáticas (contusões e distorções), para alívio da dor ligeira a moderada de variadas origens, redução da febre bem como prevenção da inflamação local como a gota (Hinz e Brune, 2008; Lionberger *et al*, 2011; Patrono e Rocca, 2009). São empregues tanto sistemicamente como localmente para dores músculo-esqueléticas e em pacientes com desordens inflamatórias das articulações. Têm efeito antipirético em adição às acções analgésicas e anti-inflamatórias (Okyar *et al*, 2012).

Os AINEs actuam fazendo diminuir as reacções inflamatórias que são acompanhadas de dor. É sabido que os derivados das PGs, que são formados a partir do ácido araquidónico, pela enzima COX, têm um papel importante na formação da inflamação e

que os níveis de PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub> são aumentados no fluido sinovial nos pacientes com AR (Okyar *et al*, 2012).

Todos os AINEs inibem a COX e actuam através da redução da síntese de PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> e prostaciclina (Massey *et al*, 2010). As duas isoformas da COX (COX-1 e COX-2) são o alvo molecular do efeito anti-inflamatório e analgésico dos AINEs. A COX-1 é importante na produção do muco gástrico e na manutenção do fluxo sanguíneo renal, por outro lado, a COX-2 é induzida por várias citocinas, factores de crescimento e endotoxinas, tendo um papel no processo inflamatório. Os AINEs não-selectivos inibem tanto a COX-1 como a COX-2 e a hipótese corrente é que a inibição da COX-2 é responsável pelo efeito anti-inflamatório dos AINEs, enquanto a inibição da COX-1 é responsável por alguns efeitos indesejados como a toxicidade gastrointestinal. Contudo, a inibição selectiva da COX-2 pode prevenir os efeitos gastrointestinais indesejados dos AINEs. Esta acção é conseguida através dos inibidores selectivos da COX-2, os COXIBs, que têm actividade anti-inflamatória sem os efeitos no estômago comparativamente aos AINEs tradicionais. Contudo, estes novos AINEs possuem efeitos secundários, uma vez que a inibição da COX-2 afecta a função renal e a pressão arterial, bem como outros parâmetros fisiológicos (Marnett, 2009; Massey *et al*, 2010; Patrono e Rocca, 2009; Brune e Hinz, 2004).

#### Propriedades físico-químicas dos anti-inflamatórios não esteróides

As propriedades físico-químicas dos fármacos são importantes na administração dérmica e transdérmica (Kalia *et al*, 1998; Potts e Francoeur, 1991; Prausnitz e Langer, 2008). Os fármacos ideais têm as seguintes propriedades: hidrossolubilidade (> 1 mg/ml), lipofilia (log P=1-3), baixo peso molecular (< 500 Dalton) e baixa temperatura de fusão (< 200°C) (Guy, 2010).

Devido a estas propriedades físico-químicas, os AINEs são moléculas ideais para a administração dérmica. Preparações dérmicas/transdérmicas da maioria dos AINEs estão disponíveis nas farmácias (Okyar *et al*, 2012). (Tabela 3)

Na administração dérmica, o acesso dos fármacos à corrente sanguínea é prevenido ou minimizado. Portanto, os efeitos adversos dos fármacos são evitados (Guy, 1996).

Os AINEs administrados por via dérmica ou transdérmica, penetram lentamente na pele e em pequenas quantidades para a circulação sistémica. Estas abordagens previnem elevados níveis locais dos fármacos, no tracto alimentar bem como a toxicidade directa dos AINEs, como vómitos e dispepsia. A administração sistémica destes fármacos pode causar interacção entre fármacos, diminuir a eficácia dos anti-hipertensores e originar retenção de fluidos. Além disso, as formulações dérmicas e transdérmicas têm uma melhor adesão dos pacientes, uma vez que podem ser os próprios a administrar e não são invasivos (Guy, 1996; Tanner e Marks, 2008; Heyneman *et al*, 2000)

Foi descrito que o uso de AINEs dérmicos levaram a uma redução nas dosagens totais diárias dos AINEs sistémicos (Sift Carter *et al*, 1997). Finalmente, a aplicação dérmica tem um maior perfil de segurança face às formulações orais. Efeitos adversos secundários dos AINEs dérmicos ocorrem em aproximadamente 10 a 15 dos pacientes e são de natureza cutânea (rash e prurido no local de aplicação) (Heyneman *et al*, 2000). A concentração dos AINEs durante a aplicação dérmica deve chegar à concentração terapêutica no tecido sinovial, fluido sinovial e nos tecidos intra-articulares. (Okyar *et al*, 2012).

## **B. Glucocorticóides**

Os glucocorticóides como a dexametasona e a prednisolona são muito eficazes no tratamento da inflamação das articulações e podem ser usados como fármacos de primeira linha devido à sua forte actividade anti-inflamatória e imuno-reguladora (Okyar *et al*, 2012). Contudo, a sua aplicação sistémica é restrita, uma vez que o uso repetido ou o uso de longa-duração causa uma elevada incidência de efeitos secundários graves como, resistência à insulina, espessamento da pele, osteoporose, hipertensão, obesidade e inibição da reparação de feridas (Saag, 2002).

Aproximadamente 44% a 75% dos pacientes com AR ainda usam glucocorticóides (Pincus *et al*, 1992; Solomon *et al*, 2002).

Inúmeros estudos sugeriram que uma baixa dose de glucocorticóides pode ter efeitos modificadores da AR. Por exemplo, baixa dose de prednisolona quando usada em combinação com outros fármacos anti-reumáticos como o metotrexato, reduz significativamente a progressão da AR (Svensson *et al*, 2005; Hafstrom *et al*, 2009).

### C. Fármacos modificadores da evolução da doença reumatisal

O termo DMARDs foi primeiramente usado nos anos 80, para se referir a agentes que se acreditava ter actividade anti-reumatisal específica. Ao contrário dos AINEs e glucocorticóides, os DMARDs alteram a progressão da AR, reduzindo ou prevenindo a destruição da articulação (Simon, 2000).

Os DMARDs não têm efeito directo no alívio da dor nem no efeito anti-inflamatório, contudo, são usados frequentemente com AINEs ou glucocorticóides numa fase inicial da AR (Mitragotri e Yoo, 2011).

O DMARD mais comumente usado é o metotrexato. Foi considerado o fármaco anti-reumatisal de primeira-linha nos últimos 20 anos devido ao seu início relativamente rápido de acção, elevada eficácia, e baixa toxicidade, bem como facilidade de administração e custo relativamente baixo. O mecanismo anti-reumatisal do metotrexato continua a não ser claro, mas tem uma actividade anti-metabólica através da inibição da síntese de purinas. A libertação de adenosina extracelular foi sugerida como um importante mecanismo para os efeitos anti-reumatisais do metotrexato (Montesinos *et al*, 2007).

### D. Fármacos biológicos

Os avanços no conhecimento da fisiopatologia da AR contribuíram para o desenvolvimento de fármacos biológicos, onde estão inseridas proteínas complexas produzidas nas culturas de células eucarióticas e procarióticas por métodos de biologia molecular (Senolt *et al*, 2009). Estas proteínas têm actividades biológicas predefinidas e têm citocinas alvo ou moléculas da superfície das células, que fornecem intervenções terapêuticas específicas com baixos efeitos imunossupressores (Strand *et al*, 2007). Alguns fármacos biológicos são categorizados como DMARDs devido aos seus efeitos modificadores da doença. Os fármacos biológicos disponíveis podem ser classificados em cinco categorias dependendo do seu alvo: anti-TNF, antagonista da IL-1 e IL-6, agentes depletos de células-B e bloqueadores da co-estimulação das células-T. Os agentes anti-TNF aumentam o risco de infecções bacterianas graves (Listing *et al*, 2005;Furst, 2010). Os perfis de risco-benefício de outros agentes biológicos estão a ser investigados (Mitragotri e Yoo, 2011).

### **iii. Promotores da administração dérmica**

Muitos métodos químicos e físicos são usados para ultrapassar a propriedade de barreira da pele na administração dérmica e transdérmica dos fármacos. A abordagem mais utilizada inclui promotores de penetração química nas formulações. Métodos físicos como a iontoforese, que promove a penetração das moléculas de fármacos pela pele, é aplicada (Tao e Desai, 2003; Mitragotri *et al*, 2000). Além disso, vectores vesiculares, microemulsões, vectores lipídicos e poliméricos garantem, a administração dérmica de fármacos através do local dérmico alvo e pela entrada dos fármacos na circulação sanguínea (Benson, 2005; Neubert, 2011).

#### **A. Promotores Químicos**

Os promotores químicos mudam reversivelmente a estrutura da pele de forma a melhorar o fluxo de fármacos através da pele. O mecanismo de acção dos promotores de penetração é explicada pela teoria da Partição-Lípido-Proteína (PLP) (Williams e Barry, 2004). De acordo com esta teoria, os promotores de penetração: i) rompem a estrutura intercelular lipídica do EC, ou ii) desnaturam ou mudam a conformação da queratina no domínio intracelular, e/ou iii) melhoram a partição dos fármacos para o EC e criam um reservatório de fármaco para actuar (Williams e Barry, 2004; Thong *et al*, 2007).

Co-solventes como álcoois, álcoois-óleos, propilenoglicóis, dietilenoglicol monoetiléter (Transcutol®) e compostos como ácidos gordos, terpenos, Azone®, dimetilsulfóxido (DMSO), pirrolidonas, ureia e tensoactivos são incluídos frequentemente em formulações dérmicas/transdérmicas como promotores de penetração (Williams e Barry, 2004).

#### **B. Promotores Físicos**

A iontoforese é o método físico mais utilizado para melhorar a penetração de fármacos. A penetração de moléculas dos fármacos é promovida pela aplicação de uma corrente eléctrica de baixo nível ( $0,5 \text{ mA/cm}^2$ ) que assegura a penetração dérmica de moléculas de fármacos polares (Kalia *et al*, 1998; Sieg e Wascotte, 2009).

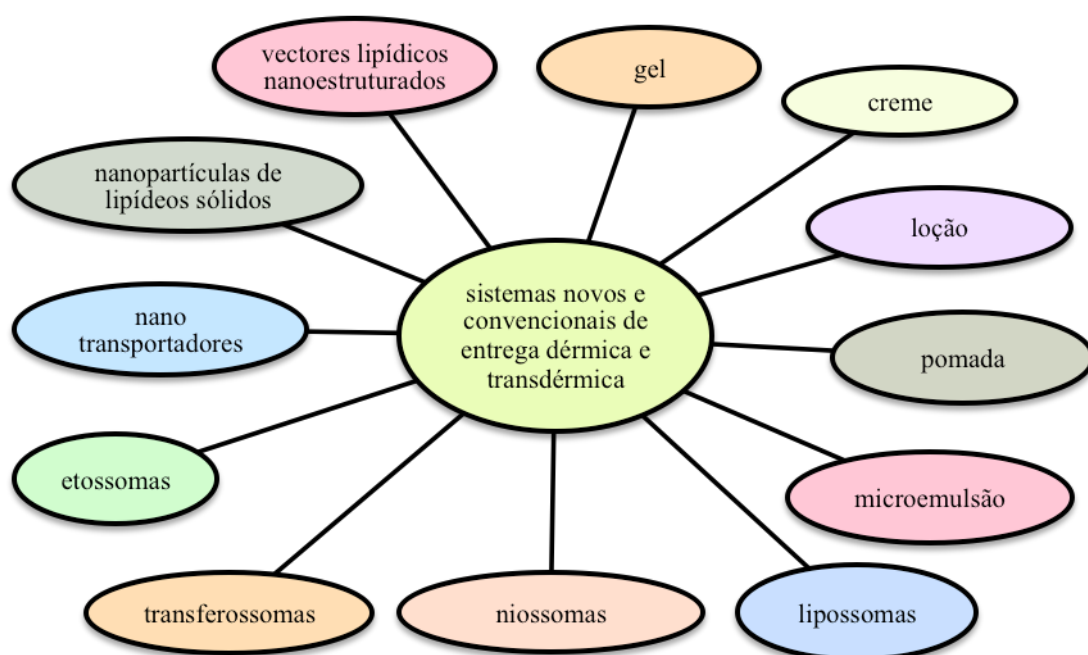
Há estudos que investigam se a iontoforese promove a penetração dérmica de AINEs ao administrar dermicamente um gel comercial contendo piroxicam. Estuda-se também a

penetração dérmica do piroxicam usando o método passivo e o método da iontoforese. Com estes estudos descobriu-se que a aplicação da baixa corrente eléctrica promoveu a captação do piroxicam para o EC. Além disso, uma elevada concentração de piroxicam foi obtida no EC, epiderme e derme. (Curdy *et al*, 2001).

Mathy e seus investigadores estudaram a penetração percutânea do flurbiprofeno em ratos sem pêlo. Investigaram as concentrações de flurbiprofeno no tecido dérmico e subcutâneo seguido da administração por iontoforese. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação da iontoforese assegurou a cedência do flurbiprofeno numa taxa elevada para a derme e tecidos subjacentes em quantidades significativas, enquanto mantém baixa exposição no plasma (Mathy *et al*, 2005).

#### iv. Novas formulações

As formas clássicas de AINEs para uso dérmico estão disponíveis em geles, cremes, pomadas e loções. Para melhorar a aplicação dérmica e transdérmica desenvolveram-se novos vectores de AINEs (Okyar *et al*, 2012). (Figura 15).



**Figura 15** – Representação esquemática dos sistemas convencionais e os novos para transporte de fármacos dérmicos (adaptada de Okyar *et al*, 2012).

## A. Microemulsões

As microemulsões são dispersões transparentes líquidas de tamanho de 20 a 200 nm. As suas formulações incluem quatro componentes fundamentais, água, óleo, tensioactivos e co-tensioactivos. As vantagens das microemulsões incluem, melhor solubilidade de fármacos, melhor estabilidade termodinâmica, fácil preparação e baixo custo (Neubert, 2011). As microemulsões atraíram atenção na promoção da permeação dérmica de fármacos lipófilos e hidrófilos. Os óleos e os tensioactivos incluídos na composição de microemulsões actuam também como promotores de penetração (Kogan e Garti, 2006). A maior desvantagem das microemulsões é o risco de irritações na pele devido ao elevado teor de tensioactivos (Okyar *et al*, 2012). Kantarci *et al*, prepararam microemulsões contendo diclofenac sódico e optimizaram-nos em testes *in vitro* (Kantarci *et al*, 2007). O efeito irritante das formulações foi investigada em voluntários saudáveis, e a sua segurança foi demonstrada (Okyar *et al*, 2012).

Noutro estudo, microemulsões de lecitina contendo cetoprofeno foram desenvolvidas (Paolino *et al*, 2002). O estudo realizado em voluntários saudáveis demonstrou que as microemulsões promoveram a permeação do fármaco e que têm uma boa tolerabilidade na pele (Amrish e Kumar, 2009).

## B. Nanovectores vesiculares

Sistemas vesiculares como lipossomas, niossomas e transferossomas têm sido desenvolvidos para a optimização da penetração dérmica dos fármacos. Estes sistemas têm a vantagem de controlar a taxa de libertação dos fármacos e de garantir a localização destes nas camadas da pele (Cevc, 2004;Elsayed *et al*, 2007).

### a. Lipossomas

Mezei e Gulasekharam usaram lipossomas como vectores de fármacos tópicos pela primeira vez (Mezei e Gulasekharam, 1980). Os lipossomas são descritos como vesículas que contém água, colesterol e fosfolipídeos. Os lipossomas conseguem capturar moléculas hidrófilas ou podem conter moléculas lipófilas nas suas membranas. Alguns lipossomas podem ser absorvidos na superfície da pele ou podem penetrar por fusão. A fusão dos lipossomas com a pele pode aumentar a força de arrasto necessária para a permeação de moléculas e facilitar a penetração dérmica do fármaco. Contudo, a

fusão dos lipossomas na superfície da pele não se aplica para fármacos macromoleculares. Outro mecanismo é a penetração dos lipossomas no EC antes da fusão com os lipídeos do EC onde vai haver libertação do fármaco. Com este mecanismo, o fármaco contido nos lipossomas sendo administrado topicamente pode ser localizado em diferentes camadas da pele (El Maghraby *et al*, 2008)

Contudo, os lipossomas são localizados na camada mais superior da pele, o EC, o que é vantajoso em casos onde a retenção do fármaco no EC é desejável. Não parece possível que com estes sistemas se consiga penetrar o fármaco para camadas mais profundas da pele nem atingir a circulação sanguínea, sendo preferidos para uso cosmético (El Maghraby *et al*, 2008).

#### b. Niossomas

Os niossomas são lipossomas preparados com tensioactivos não-iónicos. A penetração dérmica dos niossomas depende: i) do potencial de penetração dos tensioactivos presentes, ii) penetração da vesícula no EC, iii) acumulação das vesículas na superfície da pele e/ou aumento da actividade termodinâmica do fármaco na superfície da pele. Estes mecanismos dependem das propriedades físico-químicas do fármaco, da vesícula e dos lipídeos usados (Choi e Maibach, 2005).

Estes sistemas são os vectores vesiculares mais estudados em formulações dérmicas e transdérmicas de AINES, uma vez que, os niossomas previnem a perda de água transepidérmica e actuam na estrutura lipídica actuando como tensioactivos de forma a ultrapassar as características de barreira do EC (Okyar *et al*, 2012).

Foi observado que a retenção e penetração dérmica dos fármacos era promovida pela administração dérmica de uma formulação de niossomas de nimesulida. Além disso, foi determinado que as formulações de niossomas têm uma actividade anti-inflamatória mais rápida do que as formulações comerciais (Shahiwala e Misra, 2002). Manosroi *et al*, obtiveram um maior fluxo de fármaco no EC e em camadas mais profundas da pele com formulações de niossomas elásticos carregados com diclofenac dietilamónio (Manosroi *et al*, 2008).

Vesículas tipo niossomas constituídas por misturas hidratadas de colesterol e tensioactivos não iónicos são definidos como proniossomas (Alsarra *et al*, 2005; Ammar

*et al*, 2011). As formulações de proniossomas carregados com tenoxicam apresentam maior actividade analgésica e anti-inflamatória do que os comprimidos disponíveis comercialmente (Ammar *et al*, 2011).

c. Transferossomas

Os transferossomas são definidos como vesículas elásticas que podem ser muito deformadas. São a primeira geração de vesículas elásticas que contêm fosfolipídeos e um activador.

Os lipossomas clássicos têm um diâmetro que varia de 200 a 400 nm, que é muito grande para passar pelo EC. Contudo, os transferossomas chegam às camadas mais profundas da pele e mesmo à circulação sanguínea com a sua estrutura de elasticidade e elevada deformabilidade (Benson, 2009). Foi demonstrado que os lipossomas clássicos não podem ser deformados da mesma maneira, uma vez que numa comparação *in vitro* da permeação de transferossomas e lipossomas carregados com meloxicam, os transferossomas asseguraram uma maior permeabilidade na pele do que os lipossomas. No mesmo estudo, depois da administração dos transferossomas, foi descoberto que a estrutura dos lipídeos do EC foi rompida (Duangjit *et al*, 2011).

d. Etossomas

Os etossomas contêm fosfolipídeos como os lipossomas clássicos contudo, contêm elevados níveis de álcool. Foi também demonstrado, através destes vectores vesiculares, que os fármacos podem atingir camadas mais profundas da pele ou entrar na corrente sanguínea (Okyar *et al*, 2012).

O mecanismo de acção destes vectores no melhoramento da permeação é explicado pelo seu conteúdo em álcool, como promotor de penetração, assim como disruptor dos lipídeos intercelulares da estrutura do EC, pelos fosfolipídeos no seu conteúdo (Godin e Touitou, 2003). Barupal *et al*, prepararam etossomas para investigar a administração dérmica de aceclofenac demonstrando, que os etossomas têm uma maior capacidade de armazenamento de fármaco e boa estabilidade (Barupal *et al*, 2010).

### C. Nanovectores lipídicos

As nanopartículas de lipídeos sólidos (“*Solid lipid nanoparticles*” – SLNs) são emulsões A/O que contém lipídeos sólidos na fase oleosa. São preparados de lipídeos sólidos ou de misturas destes lipídeos. Os vectores lipídicos nanoestruturados (“*Nanostructured lipid carriers*” – NLCs) são a nova geração de partículas lipídicas que foram desenvolvidas para ultrapassar algumas desvantagens das SLNs, como a baixa capacidade de armazenamento de fármaco. As NLCs contém misturas de diferentes lipídeos sólidos misturados com lipídeos líquidos. A vantagem mais importante destes transportadores é o seu baixo risco de toxicidade. O pequeno tamanho das partículas garante o contacto com o EC promovendo a penetração tópica do fármaco. As nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros biologicamente degradáveis ou não degradáveis. A capacidade destas partículas para promover a penetração dos fármacos na sua aplicação dérmica/transdérmica e para acumulação no sítio alvo em diferentes camadas da pele, estão estudadas. Contudo, a administração dérmica e transdérmica das partículas poliméricas foi menos estudada do que a administração das partículas lipídicas (Okyar *et al*, 2012).

**Tabela 4** – Tabela representativa dos estudos sobre o desenvolvimento de nanotransportadores de anti-inflamatórios não esteróides para melhorar a permeabilidade da pele. NLC – vectores lipídicos nanoestruturados; SLN – nanopartículas de lipídeos sólidos. (adaptada de Okyar *et al*, 2012).

AINes	Nanotransportadores	Resultados
Celocoxib	Gel NLC	As formulações em gel preparadas com NLC exibiram uma entrada dos fármacos mais rápida assim como actividade anti-inflamatória até 24h.
Ácido flufenâmico	Nanopartículas de poli (lactido-co-glicolido)	Nanoencapsulação de ácido flufenâmico aumentou significativamente o transporte do fármaco, bem como a sua acumulação na pele.
Flurbiprofeno	NLC	Formulações de flurbiprofeno em NLC levaram a um aumento da permeação do fármaco relativamente à preparação convencional.
Flurbiprofeno	SLN	Dispersões de SLN e formulações em gel mostraram uma libertação sustentada de fármaco por um período de 24h.
Indometacina	NLC	Actividade anti-inflamatória prolongada <i>in vivo</i> , com hidrogeles de NLC comparativamente com soluções aquosas ou geles hidroalcoólicos.
Indometacina	Nanocápsulas	A distribuição transdérmica de indometacina através de nanocápsulas de poli n-butilcianoacrilato foi promovida relativamente à formulação em gel convencional.
Cetoprofeno	SLN	Formulações de SLN carregadas com cetoprofeno, mostraram um efeito anti-inflamatório prolongado quando comparado em forma de solução.
Cetorolac	NLC	A formulação de cetorolac em NLC exibiu um padrão de libertação de fármaco sustentado, devido a formar um reservatório na pele.
Nimesulida	Nanocápsulas/nanoemulsões/nanoesferas	Nanotransportadores carregados com nimesulida formulados em geles hidrofílicos exibiram boas propriedades físico-químicas para a administração dérmica.
Nimesulida	Nanocápsulas/nanoemulsões/nanoesferas	Após a aplicação de formulações em gel de nimesulida baseada em nanovectores foi detectada na epiderme viável comparativamente às formulações convencionais em gel.

### 3. Tendinites

Os tendões são tecidos especializados que conectam os músculos aos ossos, transmitindo o movimento do músculo para o osso originando os movimentos articulares. Além disso, os tendões são tecidos vivos que respondem aos esforços mecânicos, como às mudanças no metabolismo (Wang, 2006). A tendinite é uma condição dolorosa de resposta ao trauma directo ou uso repetitivo (Dohnert *et al*, 2012).

Foi provado que os tendões sujeitos ao uso excessivo sofrem uma fase curta de inflamação. Em casos crónicos, isto é, em condições dolorosas por uso excessivo do tendão, as abordagens terapêuticas comumente adaptadas com o objectivo de modular a resposta inflamatória têm tido um sucesso limitado. Assim, o termo “tendinopatia” tem sido muito usado para descrever a variedade das condições resultantes do uso excessivo (Andres e Murrell, 2008).

As duas citocinas pró-inflamatórias expressas na tendinopatia são a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  é a citocina inflamatória que inicia a cascata de outras citocinas e factores trópicos (Xu e Murrell, 2008). Um estudo demonstrou que TNF- $\alpha$  é distribuído e expresso em tendinócitos no processo inflamatório, e que estas células submetem-se a elevada apoptose bem como proliferação na inflamação do tendão. Um aumento significativo da expressão destas citocinas inflamatórias nas tendinites leva à proliferação dos fibroblastos e consequente degeneração do tendão (Dohnert *et al*, 2012).

Nino *et al* e Grewal *et al*, estudaram a possibilidade de moléculas grandes serem transportadas por iontoforese e que a estrutura molecular é a chave para o transporte através da iontoforese, sendo a sequência de grupos químicos na estrutura molecular também importante (Nino *et al*, 2010; Grewal *et al*, 2000).

Recentemente, os nanomateriais, cujas dimensões se situam entre 1-100 nm, têm sido usados no desenvolvimento de dispositivos únicos que possibilitam novas propriedades funcionais do ponto de vista físico e químico (Daniel e Astruc, 2004).

Os nanovectores representam uma nova plataforma para o transporte de agentes terapêuticos para alvos específicos. Mais especificamente, as Au-NPs tornaram-se objecto de especial interesse devido às suas propriedades ópticas, eléctricas, de

oxidação-redução, e catalíticas (Daniel e Astruc, 2004). Sendo hoje em dia vistas como uma alternativa atractiva, ao transporte de várias proteínas, moléculas de fármaco pequenas, biomoléculas grandes, ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN). Hoje em dia é sabido que a libertação destes agentes terapêuticos é uma condição para o sucesso da terapia (Ghosh *et al*, 2008).

Além de serem inertes e não-tóxicas, as Au-NPs são fáceis de preparar e estáveis em solução. Podem ser preparadas em vários tamanhos e formas (Ghosh *et al*, 2008) sendo capazes de libertar moléculas grandes e não apenas moléculas de fármacos pequenas (Dohnert *et al*, 2012).

Tsai *et al*, avaliaram a libertação intra-articular das Au-NPs em artrite induzida em modelo rato e observaram que a técnica inibiu a proliferação, bem como a sua migração reduzindo a densidade dos microcapilares e macrófagos, assim como os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Tsai *et al*, 2007).

Outro estudo, testa a hipótese que as Au-NPs usadas em iontoforese aumentam a potência do fármaco, diclofenac dietilamónio, promovendo o efeito anti-inflamatório ideal no tratamento da tendinite de Aquiles em ratos (Dohnert *et al*, 2012). Neste mesmo estudo, foram realizados três grupos de tratamento em tendões magoados, em que um grupo foi sujeito a um tratamento com iontoforese juntamente com diclofenac dietilamónio; o segundo grupo foi sujeito à iontoforese mais gel de Au-NPs e o último grupo foi tratado com iontoforese, diclofenac dietilamónio e o gel de Au-NPs. Os resultados obtidos revelaram uma diminuição significativa da expressão das IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  nos três grupos de tratamento, quando comparado com grupo controlo (ratos sem tratamento). Contudo, a expressão mais baixa da IL-1 $\beta$  foi observada no último grupo, tratado com iontoforese, diclofenac dietilamónio e Au-NPs, com diferença significativa contra os outros grupos de tratamento. Em contraste com a expressão IL-1 $\beta$ , que nos três grupos se verificou baixas significativas, uma descida significativa na expressão de TNF- $\alpha$  foi observada apenas no grupo tratado com iontoforese, diclofenac dietilamónio e Au-NPs (Dohnert *et al*, 2012).

As Au-NPs exercem uma acção anti-inflamatória e sinérgica pois permitem o transporte do fármaco usado, promovendo o controlo das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , através da iontoforese, na tendinopatia em modelo animal (Dohnert *et al*, 2012).

#### IV. Conclusões e perspectivas futuras

O campo dos nanovectores de fármacos, através da pele progrediu na última dúzia de anos até um ponto onde há elementos bem caracterizadas como, as nanopartículas lipídicas, com capacidade farmacocinética personalizada. Existem nanopartículas que permitem aumentar ou diminuir o fluxo de fármaco, personalizar a localização do depósito e o tamanho para permear selectivamente o EC. Compreender a interacção das nanopartículas com as estruturas da pele como folículos pilosos, poros, etc., é muito importante para melhorar o transporte percutâneo de fármacos (Prow *et al*, 2011).

A pele é um sítio imunologicamente importante que possui uma barreira, contudo tem o potencial de ser um local para vacinação não invasiva. A TCI oferece uma vacinação eficaz, fácil de usar, não dolorosa, com poucos efeitos secundários e manuseamento mais seguro do que as injeções convencionais. (Bal *et al*, 2010b).

Os principais desafios da TCI são garantir a distribuição específica de antígenos até à epiderme ou derme onde as LCs e DCs existem e efectivamente activar as respostas imunes específicas (Li *et al*, 2011).

Os sistemas mais promissores para a TCI combinam a disrupção da barreira, como por exemplo as microagulhas, com a adição de adjuvantes na formulação da vacina. Para que as formulações particuladas tenham sucesso, a disrupção da barreira tem uma importância crucial (Bal *et al*, 2010b).

A combinação de nanovectores com diferentes promotores físicos conduzem a melhores resposta imunes, levando a uma TCI bem-sucedida (Li *et al*, 2011).

Nas últimas duas décadas, a pele foi mostrada como um sítio possível de distribuição de fármacos. Investigadores tentam ultrapassar efeitos secundários gastrointestinais dos AINEs, através da administração dérmica e transdérmica. A administração dérmica permite a distribuição local do fármaco em tecidos lesados e obtém elevada concentração de fármaco no sítio de aplicação. Este tipo de aplicação, parece oferecer uma via alternativa de aplicação para prevenir efeitos secundários sistémicos dos AINEs. Contudo, o EC é uma barreira para a absorção de fármacos através da pele e os fármacos podem não acumular adequadamente nos tecidos alvo. A estratégia mais

popular é incluir promotores químicos nas formulações, de forma a promover a distribuição do fármaco pela pele (Okyar *et al*, 2012).

Outra abordagem para melhorar a permeação da pele é desenvolver novos sistemas de transporte de AINEs, em adição às formas de dosagem tradicionais. As microemulsões e os nanovectores são os mais frequentemente usados para os AINEs. Estes novos vectores de fármacos asseguram a permeação dos fármacos para camadas mais profundas da pele e chegam ao fluido sinovial. Estas novas abordagens terapêuticas diminuem a dose de fármaco necessária, desviando os fármacos para o tecido alvo, o que conseqüentemente aumenta a sua eficácia. (Okyar *et al*, 2012).

As descobertas parecem ser promissoras e pode ser antecipado que estes novos vectores, que promovem a localização dos fármacos na epiderme e derme viáveis, podem entrar no mercado. Assim, pelo emprego destes novos sistemas conseguimos atingir um grande avanço na administração segura de AINEs (Okyar *et al*, 2012).

## V. Bibliografia

- Ada, G. (2003). Overview of vaccines. *Methods Mol Med*, 87, pp. 1-17.
- Alarcon, J. B., *et al* (2007). Preclinical evaluation of microneedle technology for intradermal delivery of influenza vaccines. *Clin Vaccine Immunol*, 14, pp. 375-381.
- Alsarra, I. A., *et al* (2005). Proniosomes as a drug carrier for transdermal delivery of ketorolac. *Eur J Pharm Biopharm*, 59, pp. 485-490.
- Ammar, H. O., *et al* (2011). Proniosomes as a carrier system for transdermal delivery of tenoxicam. *Int J Pharm*, 405, pp. 142-152.
- Amrish, C. e Kumar, S. P. (2009). Transdermal delivery of ketorolac. *Yakugaku Zasshi*, 129, pp. 373-379.
- Andres, B. M. e Murrell, G. A. (2008). Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res*, 466, pp. 1539-1554.
- Bal, S. M., *et al* (2010a). Microneedle-based transcutaneous immunisation in mice with N-trimethyl chitosan adjuvanted diphtheria toxoid formulations. *Pharm Res*, 27, pp. 1837-1847.
- Bal, S. M., *et al* (2010b). Advances in transcutaneous vaccine delivery: do all ways lead to Rome? *J Control Release*, 148, pp. 266-282.
- Bal, S. M., *et al* (2011). Small is beautiful: N-trimethyl chitosan-ovalbumin conjugates for microneedle-based transcutaneous immunisation. *Vaccine*, 29, pp. 4025-4032.
- Bal, S. M., *et al* (2010c). Efficient induction of immune responses through intradermal vaccination with N-trimethyl chitosan containing antigen formulations. *J Control Release*, 142, pp. 374-383.
- Barupal, A. K., Gupta, V. e Ramteke, S. (2010). Preparation and Characterization of Ethosomes for Topical delivery of Aceclofenac. *Indian J Pharm Sci*, 72, pp. 582-586.
- Benson, H. A. (2005). Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv*, 2, pp. 23-33.
- Benson, H. A. (2009). Elastic liposomes for topical and transdermal drug delivery. *Curr Drug Deliv*, 6, pp. 217-226.
- Bos, J. D. e Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, 9, pp. 165-169.
- Brune, K. e Hinz, B. (2004). The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum*, 50, pp. 2391-2399.
- Caubet, C., *et al* (2004). Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol*, 122, pp. 1235-1244.
- Centers for Disease, C. e Prevention (2001). Prevalence of disabilities and associated health conditions among adults--United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 50, pp. 120-125.
- Cevc, G. (2004). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, pp. 675-711.
- Cevc, G. e Vierl, U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J Control Release*, 141, pp. 277-299.
- Chen, D., Maa, Y. F. e Haynes, J. R. (2002). Needle-free epidermal powder immunization. *Expert Rev Vaccines*, 1, pp. 265-276.

- Chen, X., *et al* (2010). A novel laser vaccine adjuvant increases the motility of antigen presenting cells. *PLoS One*, 5, pp. e13776.
- Chen, X., *et al* (2009). Dry-coated microprojection array patches for targeted delivery of immunotherapeutics to the skin. *J Control Release*, 139, pp. 212-220.
- Choi, M. J. e Maibach, H. I. (2005). Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol Physiol*, 18, pp. 209-219.
- Choy, E. H. e Panayi, G. S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344, pp. 907-916.
- Cui, Z., *et al* (2003). Novel ethanol-in-fluorocarbon microemulsions for topical genetic immunization. *Pharm Res*, 20, pp. 16-23.
- Cui, Z. e Sloat, B. R. (2006). Topical immunization onto mouse skin using a microemulsion incorporated with an anthrax protective antigen protein-encoding plasmid. *Int J Pharm*, 317, pp. 187-191.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J. e Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology*, 92, pp. 388-395.
- Curdy, C., *et al* (2001). Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion. *J Control Release*, 76, pp. 73-79.
- Dahlan, A., Alpar, H. O. e Murdan, S. (2009a). An investigation into the combination of low frequency ultrasound and liposomes on skin permeability. *Int J Pharm*, 379, pp. 139-142.
- Dahlan, A., *et al* (2009b). Transcutaneous immunisation assisted by low-frequency ultrasound. *Int J Pharm*, 368, pp. 123-128.
- Daniel, M. C. e Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*, 104, pp. 293-346.
- Davis, S. P., *et al* (2004). Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *J Biomech*, 37, pp. 1155-1163.
- Ding, Z., *et al* (2011). Transcutaneous immunization studies in mice using diphtheria toxoid-loaded vesicle formulations and a microneedle array. *Pharm Res*, 28, pp. 145-158.
- Ding, Z., *et al* (2008). Preparation and characterization of diphtheria toxoid-loaded elastic vesicles for transcutaneous immunization. *J Drug Target*, 16, pp. 555-563.
- Ding, Z., *et al* (2009a). Immune modulation by adjuvants combined with diphtheria toxoid administered topically in BALB/c mice after microneedle array pretreatment. *Pharm Res*, 26, pp. 1635-1643.
- Ding, Z., *et al* (2009b). Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice. *J Control Release*, 136, pp. 71-78.
- Dohnert, M. B., *et al* (2012). Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine*, 7, pp. 1651-1657.
- Donnelly, R. F., Raj Singh, T. R. e Woolfson, A. D. (2010). Microneedle-based drug delivery systems: microfabrication, drug delivery, and safety. *Drug Deliv*, 17, pp. 187-207.
- Drape, R. J., *et al* (2006). Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine*, 24, pp. 4475-4481.

- Duangjit, S., *et al* (2011). Characterization and In Vitro Skin Permeation of Meloxicam-Loaded Liposomes versus Transfersomes. *J Drug Deliv*, 2011, pp. 4183-16.
- El Maghraby, G. M., Barry, B. W. e Williams, A. C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 34, pp. 203-222.
- Elias, P. M. e Menon, G. K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res*, 24, pp. 1-26.
- Elsayed, M. M., *et al* (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *Int J Pharm*, 332, pp. 1-16.
- Firestein, G. S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, pp. 356-361.
- Furst, D. E. (2010). The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 39, pp. 327-346.
- Garrod, T. e Pitzalis, C. (2006). Targeting the inflamed synovium: the quest for specificity. *Arthritis Rheum*, 54, pp. 1055-1060.
- Genetically Modified Crops. [Em linha]. Disponível em < <http://gmcrops.yolasite.com/methods-of-genetic-engineering> >. Consultado em [10/07/14].
- Ghosh, P., *et al* (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, pp. 1307-1315.
- Gill, H. S. e Prausnitz, M. R. (2007a). Coated microneedles for transdermal delivery. *J Control Release*, 117, pp. 227-237.
- Gill, H. S. e Prausnitz, M. R. (2007b). Coating formulations for microneedles. *Pharm Res*, 24, pp. 1369-1380.
- Glenn, G. M., Scharton-Kersten, T. e Alving, C. R. (1999). Advances in vaccine delivery: transcutaneous immunisation. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, pp. 797-805.
- Godin, B. e Touitou, E. (2003). Ethosomes: new prospects in transdermal delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 20, pp. 63-102.
- Grewal, B. S., *et al* (2000). Transdermal macromolecular delivery: real-time visualization of iontophoretic and chemically enhanced transport using two-photon excitation microscopy. *Pharm Res*, 17, pp. 788-795.
- Guy, R. H. (1996). Current status and future prospects of transdermal drug delivery. *Pharm Res*, 13, pp. 1765-1769.
- Guy, R. H. (2010). Transdermal drug delivery. *Handb Exp Pharmacol*, pp. 399-410.
- Hafstrom, I., *et al* (2009). Remission achieved after 2 years treatment with low-dose prednisolone in addition to disease-modifying anti-rheumatic drugs in early rheumatoid arthritis is associated with reduced joint destruction still present after 4 years: an open 2-year continuation study. *Ann Rheum Dis*, 68, pp. 508-513.
- Hammond, S. A., *et al* (2001). Transcutaneous immunization: an emerging route of immunization and potent immunostimulation strategy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 18, pp. 503-526.
- Hammond, S. A., *et al* (2000). Transcutaneous immunization of domestic animals: opportunities and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*, 43, pp. 45-55.
- Henderson, D., Grabenstein, J., L.L., B. (2008). Smallpox and vaccinia. In: Orenstein, W., Offit, P., Plotkin, S. (Ed.). *Vaccines*. Amsterdam, Elsevier, pp.773-803.
- Heuschkel, S., Goebel, A. e Neubert, R. H. (2008). Microemulsions--modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *J Pharm Sci*, 97, pp. 603-631.
- Heyneman, C. A., Lawless-Liday, C. e Wall, G. C. (2000). Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs*, 60, pp. 555-574.

- Hilleman, M. R. (2000). Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine*, 18, pp. 1436-1447.
- Hinz, B. e Brune, K. (2008). Can drug removals involving cyclooxygenase-2 inhibitors be avoided? A plea for human pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, 29, pp. 391-397.
- Hirobe, S., Okada, N. e Nakagawa, S. (2013). Transcutaneous vaccines--current and emerging strategies. *Expert Opin Drug Deliv*, 10, pp. 485-498.
- Hoffman, A. S. (2008). The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *J Control Release*, 132, pp. 153-163.
- Hooper, L., *et al* (2004). The effectiveness of five strategies for the prevention of gastrointestinal toxicity induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review. *BMJ*, 329, pp. 948.
- Huang, H. N., *et al* (2009). Transdermal immunization with low-pressure-gene-gun mediated chitosan-based DNA vaccines against Japanese encephalitis virus. *Biomaterials*, 30, pp. 6017-6025.
- Huang, Y., *et al* (2010). Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. *Biomaterials*, 31, pp. 9086-9091.
- Infomedica Wiki. [Em linha]. Disponível em < [http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas\\_da\\_pele.jpg](http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Arquivo:Camadas_da_pele.jpg) >. [Consultado em 15/07/2014]
- InTech. [Em linha]. Disponível em < <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-novel-drug-carrier-systems/niosomes-as-carrier-in-dermal-drug-delivery> >. [Consultado em 15/07/2014]
- Ito, Y., *et al* (2006a). Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin. *Eur J Pharm Sci*, 29, pp. 82-88.
- Ito, Y., *et al* (2006b). Self-dissolving microneedles for the percutaneous absorption of EPO in mice. *J Drug Target*, 14, pp. 255-261.
- Jacobson, R. M., *et al* (2001). Making vaccines more acceptable--methods to prevent and minimize pain and other common adverse events associated with vaccines. *Vaccine*, 19, pp. 2418-2427.
- Jain, S., *et al* (2003). Transfersomes--a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*, 29, pp. 1013-1026.
- Jepps, O. G., *et al* (2013). Modeling the human skin barrier--towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, pp. 152-168.
- Jones, S., *et al* (2009). DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine*, 27, pp. 2506-2512.
- Kale, T. e Momin, M. (2014). Needle free injection technology – An overview. [Em linha]. Disponível em < [http://www.pharmacy.umn.edu/innovations/prod/groups/cop/@pub/@cop/@innov/documents/article/cop\\_article\\_473898.pdf](http://www.pharmacy.umn.edu/innovations/prod/groups/cop/@pub/@cop/@innov/documents/article/cop_article_473898.pdf) >. Consultado em [10/07/14].
- Kalia, Y. N., *et al* (1998). Ion mobility across human stratum corneum in vivo. *J Pharm Sci*, 87, pp. 1508-1511.
- Kanchan, V. e Panda, A. K. (2007). Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*, 28, pp. 5344-5357.

- Kantarci, G., *et al* (2007). Comparison of different water/oil microemulsions containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate, and skin irritation studies. *AAPS PharmSciTech*, 8, pp. E91.
- Kelly, K., *et al* (2008). Preventing contamination between injections with multiple-use nozzle needle-free injectors: a safety trial. *Vaccine*, 26, pp. 1344-1352.
- Knockenbauer, K. E., *et al* (2008). Protective antigen composite nanofibers as a transdermal anthrax vaccine. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008, pp. 1040-1043.
- Koch, A. E. (2003). Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 62 Suppl 2, pp. ii60-67.
- Kogan, A. e Garti, N. (2006). Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*, 123-126, pp. 369-385.
- Kohli, A. K. e Alpar, H. O. (2004). Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int J Pharm*, 275, pp. 13-17.
- Koutsonanos, D. G., *et al* (2009). Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. *PLoS One*, 4, pp. e4773.
- Lawrence, R. C., *et al* (1998). Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*, 41, pp. 778-799.
- Lee, C. M. e Maibach, H. I. (2006). Deep percutaneous penetration into muscles and joints. *J Pharm Sci*, 95, pp. 1405-1413.
- Lee, P. W., *et al* (2008). The use of biodegradable polymeric nanoparticles in combination with a low-pressure gene gun for transdermal DNA delivery. *Biomaterials*, 29, pp. 742-751.
- Lee, S. W., *et al* (2012). Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials*, 33, pp. 1563-1572.
- Li, N., *et al* (2011). Transcutaneous vaccines: novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers. *Vaccine*, 29, pp. 6179-6190.
- Lieb, L. M., *et al* (1997). Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin in vitro. *J Pharm Sci*, 86, pp. 1022-1029.
- Lionberger, D. R., *et al* (2011). Diclofenac epolamine topical patch relieves pain associated with ankle sprain. *J Pain Res*, 4, pp. 47-53.
- Listing, J., *et al* (2005). Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis Rheum*, 52, pp. 3403-3412.
- Lu, D. e Hickey, A. J. (2007). Pulmonary vaccine delivery. *Expert Rev Vaccines*, 6, pp. 213-226.
- Macklin, M. D., *et al* (1998). Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus. *J Virol*, 72, pp. 1491-1496.
- Madsen, H. B., *et al* (2010). Investigation of the interaction between modified ISCOMs and stratum corneum lipid model systems. *Biochim Biophys Acta*, 1798, pp. 1779-1789.
- Madsen, H. B., *et al* (2009). In vitro cutaneous application of ISCOMs on human skin enhances delivery of hydrophobic model compounds through the stratum corneum. *AAPS J*, 11, pp. 728-739.
- Manosroi, A., Jantrawut, P. e Manosroi, J. (2008). Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium. *Int J Pharm*, 360, pp. 156-163.

- Marjukka Suhonen, T., Bouwstra, J. A. e Urtti, A. (1999). Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J Control Release*, 59, pp. 149-161.
- Marnett, L. J. (2009). The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 49, pp. 265-290.
- Martanto, W., et al (2006). Mechanism of fluid infusion during microneedle insertion and retraction. *J Control Release*, 112, pp. 357-361.
- Massey, T., et al (2010). Topical NSAIDs for acute pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, pp. CD007402.
- Mathers, A. R. e Larregina, A. T. (2006). Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol Res*, 36, pp. 127-136.
- Mathy, F. X., et al (2005). Study of the percutaneous penetration of flurbiprofen by cutaneous and subcutaneous microdialysis after iontophoretic delivery in rat. *J Pharm Sci*, 94, pp. 144-152.
- Matsuo, K., et al (2011). Transcutaneous vaccination using a hydrogel patch induces effective immune responses to tetanus and diphtheria toxoid in hairless rat. *J Control Release*, 149, pp. 15-20.
- Mattheolabakis, G., et al (2010). Transcutaneous delivery of a nanoencapsulated antigen: induction of immune responses. *Int J Pharm*, 385, pp. 187-193.
- Mcallister, D. V., et al (2003). Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, pp. 13755-13760.
- Meidan, V. M., et al (1998). Low intensity ultrasound as a probe to elucidate the relative follicular contribution to total transdermal absorption. *Pharm Res*, 15, pp. 85-92.
- Mezei, M. e Gulasekharam, V. (1980). Liposomes--a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. *Life Sci*, 26, pp. 1473-1477.
- Miksza, J. A. e Laurent, P. E. (2008). Cutaneous delivery of prophylactic and therapeutic vaccines: historical perspective and future outlook. *Expert Rev Vaccines*, 7, pp. 1329-1339.
- Miller, M. A. e Pisani, E. (1999). The cost of unsafe injections. *Bull World Health Organ*, 77, pp. 808-811.
- Mishra, D., et al (2006). Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. *Vaccine*, 24, pp. 4847-4855.
- Mitragotri, S., et al (2000). Determination of threshold energy dose for ultrasound-induced transdermal drug transport. *J Control Release*, 63, pp. 41-52.
- Mitragotri, S. e Yoo, J. W. (2011). Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis. *Arch Pharm Res*, 34, pp. 1887-1897.
- Mittal, A., Raber, A. S. e Hansen, S. (2013). Particle based vaccine formulations for transcutaneous immunization. *Hum Vaccin Immunother*, 9, pp.
- Miyano, T., et al (2005). Sugar micro needles as transdermic drug delivery system. *Biomed Microdevices*, 7, pp. 185-188.
- Mohamed, F. e Van Der Walle, C. F. (2006). PLGA microcapsules with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA. *Int J Pharm*, 311, pp. 97-107.
- Montesinos, M. C., et al (2007). The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum*, 56, pp. 1440-1445.

- Mura, S., *et al* (2007). Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil. *J Drug Target*, 15, pp. 101-108.
- Nagpal, K., Singh, S. K. e Mishra, D. N. (2010). Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 58, pp. 1423-1430.
- Naoui, W., *et al* (2011). Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. *Pharm Res*, 28, pp. 1683-1695.
- Nestle, F. O. e Nickoloff, B. J. (2007). Deepening our understanding of immune sentinels in the skin. *J Clin Invest*, 117, pp. 2382-2385.
- Neubert, R. H. (2011). Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 77, pp. 1-2.
- Nino, M., Calabro, G. e Santoianni, P. (2010). Topical delivery of active principles: the field of dermatological research. *Dermatol Online J*, 16, pp. 4.
- Okyar, A., *et al* (2012) Novel Formulation Approaches for Dermal and Transdermal Delivery of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Rheumatoid Arthritis – Treatment, Dr. Andrew Lemmey (Ed.), ISBN: 978-953-307-850-2. InTech. [Em linha]. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/rheumatoid-arthritis-treatment/novel-formulation-approaches-for-dermal-and-transdermal-delivery-of-non-steroidal-anti-inflammatory->. (Consultado em 10/01/14).
- Panyam, J. e Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, pp. 329-347.
- Paolino, D., *et al* (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *Int J Pharm*, 244, pp. 21-31.
- Papakostas, D., *et al* (2011). Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res*, 303, pp. 533-550.
- Patrono, C. e Rocca, B. (2009). Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future. *Pharmacol Res*, 59, pp. 285-289.
- Paul, A., Cevc, G. e Bachhawat, B. K. (1998). Transdermal immunisation with an integral membrane component, gap junction protein, by means of ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Vaccine*, 16, pp. 188-195.
- Pincus, T., Marcum, S. B. e Callahan, L. F. (1992). Longterm drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices: II. Second line drugs and prednisone. *J Rheumatol*, 19, pp. 1885-1894.
- Ponvert, C. e Scheinmann, P. (2003). Vaccine allergy and pseudo-allergy. *Eur J Dermatol*, 13, pp. 10-15.
- Potts, R. O. e Francoeur, M. L. (1991). The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J Invest Dermatol*, 96, pp. 495-499.
- Prausnitz, M. R. e Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*, 26, pp. 1261-1268.
- Prausnitz, M. R., *et al* (2009). Microneedle-based vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*, 333, pp. 369-393.
- Prego, C., *et al* (2010). Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine*, 28, pp. 2607-2614.
- Prow, T. W., *et al* (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, pp. 470-491.
- Reihnsner, R., Balogh, B. e Menzel, E. J. (1995). Two-dimensional elastic properties of human skin in terms of an incremental model at the in vivo configuration. *Med Eng Phys*, 17, pp. 304-313.

- Saag, K. G. (2002). Glucocorticoid use in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 4, pp. 218-225.
- Santos, P., *et al* (2008). Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacol Physiol*, 21, pp. 246-259.
- Schijns, V. E. (2000). Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*, 12, pp. 456-463.
- Schwarzenberger, K. e Udey, M. C. (1996). Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J Invest Dermatol*, 106, pp. 553-558.
- Sen, A., Zhao, Y. L. e Hui, S. W. (2002). Saturated anionic phospholipids enhance transdermal transport by electroporation. *Biophys J*, 83, pp. 2064-2073.
- Senolt, L., *et al* (2009). Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 9, pp. 102-107.
- Seya, T., *et al* (2006). Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *Evid Based Complement Alternat Med*, 3, pp. 31-38; discussion 133-137.
- Shahiwala, A. e Misra, A. (2002). Studies in topical application of niosomally entrapped Nimesulide. *J Pharm Pharm Sci*, 5, pp. 220-225.
- Sieg, A. e Wascotte, V. (2009). Diagnostic and therapeutic applications of iontophoresis. *J Drug Target*, 17, pp. 690-700.
- Sift Carter, R., *et al* (1997). Use of topical NSAIDs in patients receiving systemic NSAID treatment: a pharmacy-based study in Germany. *J Clin Epidemiol*, 50, pp. 217-218.
- Simerska, P., *et al* (2009). Oral vaccine delivery--new strategies and technologies. *Curr Drug Deliv*, 6, pp. 347-358.
- Simon, L. S. (2000). DMARDs in the treatment of rheumatoid arthritis: current agents and future developments. *Int J Clin Pract*, 54, pp. 243-249.
- Sintov, A. C. e Botner, S. (2006). Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int J Pharm*, 311, pp. 55-62.
- Slutter, B., Hagenars, N. e Jiskoot, W. (2008). Rational design of nasal vaccines. *J Drug Target*, 16, pp. 1-17.
- Slutter, B., *et al* (2009). Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. *J Control Release*, 138, pp. 113-121.
- Solomon, D. H., *et al* (2002). Management of glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis: rates and predictors of care in an academic rheumatology practice. *Arthritis Rheum*, 46, pp. 3136-3142.
- Strand, V., Kimberly, R. e Isaacs, J. D. (2007). Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov*, 6, pp. 75-92.
- Su, X., *et al* (2009). Layer-by-layer-assembled multilayer films for transcutaneous drug and vaccine delivery. *ACS Nano*, 3, pp. 3719-3729.
- Sullivan, S. P., *et al* (2010). Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nat Med*, 16, pp. 915-920.
- Svensson, B., *et al* (2005). Low-dose prednisolone in addition to the initial disease-modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate: a two-year randomized trial. *Arthritis Rheum*, 52, pp. 3360-3370.

- Tahara, Y., *et al* (2010). Transcutaneous immunization by a solid-in-oil nanodispersion. *Chem Commun (Camb)*, 46, pp. 9200-9202.
- Takatani-Nakase, T., *et al* (2012). Transcutaneous immunization system using a hydrotropic formulation induces a potent antigen-specific antibody response. *PLoS One*, 7, pp. e47980.
- Tanner, T. e Marks, R. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Res Technol*, 14, pp. 249-260.
- Tao, S. L. e Desai, T. A. (2003). Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, pp. 315-328.
- Tarner, I. H., *et al* (2005). The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 19, pp. 19-35.
- Taveira, S. F., Nomizo, A. e Lopez, R. F. (2009). Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. *J Control Release*, 134, pp. 35-40.
- Tezel, A., *et al* (2005). Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine*, 23, pp. 3800-3807.
- Thong, H. Y., Zhai, H. e Maibach, H. I. (2007). Percutaneous penetration enhancers: an overview. *Skin Pharmacol Physiol*, 20, pp. 272-282.
- Trommer, H. e Neubert, R. H. (2006). Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol*, 19, pp. 106-121.
- Tsai, C. Y., *et al* (2007). Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum*, 56, pp. 544-554.
- Van Der Laan, J. W. (2005). Adjuvants enhancing an integral immune response to antigens. 15-17 September, 2004, Modern Vaccine/Adjuvant Formulation: impact on future development (MVAFA 2004), Prague. *Expert Rev Vaccines*, 4, pp. 15-18.
- Vanbever, R., Lecouturier, N. e Preat, V. (1994). Transdermal delivery of metoprolol by electroporation. *Pharm Res*, 11, pp. 1657-1662.
- Vogt, A., *et al* (2006). 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol*, 126, pp. 1316-1322.
- Vyas, S. P., *et al* (2005). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *Int J Pharm*, 296, pp. 80-86.
- Walther, C., *et al* (2008). Quantum dot-carrier peptide conjugates suitable for imaging and delivery applications. *Bioconj Chem*, 19, pp. 2346-2356.
- Wang, B., Amerio, P. e Sauder, D. N. (1999). Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol*, 66, pp. 33-39.
- Wang, J. H. (2006). Mechanobiology of tendon. *J Biomech*, 39, pp. 1563-1582.
- Weaver, J. C. (1995). Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol Biol*, 55, pp. 3-28.
- Widera, G., *et al* (2006). Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine*, 24, pp. 1653-1664.
- Williams, A. (2003). Transdermal and dermal drug delivery: From theory to clinical practice. *Pharmaceutical Press*.
- Williams, A. C. e Barry, B. W. (2004). Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, pp. 603-618.

- Williams, N. A. (2000). Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. *Int J Med Microbiol*, 290, pp. 447-453.
- Wilson-Welder, J. H., *et al* (2009). Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci*, 98, pp. 1278-1316.
- Wolfe, F., *et al* (1994). The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 37, pp. 481-494.
- Wood, L. C., *et al* (1992). Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest*, 90, pp. 482-487.
- Xu, Y. e Murrell, G. A. (2008). The basic science of tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res*, 466, pp. 1528-1538.
- Zhou, M., *et al* (2007). Peptide-labeled quantum dots for imaging GPCRs in whole cells and as single molecules. *Bioconjug Chem*, 18, pp. 323-332.
- Zhu, Q., *et al* (2009). Immunization by vaccine-coated microneedle arrays protects against lethal influenza virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, pp. 7968-7973.
- Zwerina, J., *et al* (2005). Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci*, 1051, pp. 716-729.