

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

STELLA MARIA DE SOUZA MORAIS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA SÉRICA BOVINA CONJUGADAS A ANTÍGENOS TOTAIS DE
Pseudomonas aeruginosa EM MODELO DE INFECÇÃO PELA CEPA VIRULENTA
DE *P. aeruginosa***

Alfenas/MG

2018

STELLA MARIA DE SOUZA MORAIS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA SÉRICA BOVINA CONJUGADAS A ANTÍGENOS TOTAIS DE
Pseudomonas aeruginosa EM MODELO DE INFECÇÃO PELA CEPA VIRULENTA
DE *P. aeruginosa***

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

Área de Concentração: Interação patógeno-hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2018

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

Morais, Stella Maria de Souza
M827a Avaliação do potencial vacinal de nanopartículas de albumina sérica bovina conjugadas a antígenos totais de *Pseudomonas aeruginosa* em modelo de infecção pela Cepa Virulenta de *P. aeruginosa* / Stella Maria de Souza Moraes. -- Alfenas/MG, 2018.
90 f. : il. -

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Nanopartículas. 3. Albumina Sérica -- Bovina. 4. Vacinas. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

CDD-579.332



STELLA MARIA DE SOUZA MORAIS

“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA
SÉRICA BOVINA CONJUGADAS A ANTÍGENOS TOTAIS DE *Pseudomonas aeruginosa* EM
MODELO DE INFECÇÃO PELA CEPA VIRULENTE DE *P. aeruginosa*”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 2 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Felipe Leomil Coelho

Profa. Dra. Juliana Falcão Rodrigues

Instituição: USP

Assinatura: J. Falcão Rodrigues

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Amanda Latércia Tranches Dias

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Felipe, pelo incentivo, pela confiança depositada em mim, pela paciência e principalmente, por ter contribuído para minha formação intelectual e evolução como pesquisadora desde a graduação até o fim desse mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela dedicação em transmitir seus conhecimentos e experiência.

A minha mãe Sandra, pela paciência, apoio, por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis dessa caminhada e por não me deixar desistir.

Ao Alex, pelo incentivo, compreensão, pelas palavras de conforto e por me transmitir segurança.

Aos amigos do Laboratório de Vacinas, Alessandra, Andressa, Bianca, Camila, Ezequiel, Fernanda Tana, Fernanda Roza, Gabriel, Gabriela, Isabella, Lauana, Luiz Gustavo, Natália, Pedro, Raissa e Val, por toda ajuda no dia-a-dia, e até nos finais de semana e feriados. Pelos momentos de descontração e risadas, que tornaram as horas de trabalho no laboratório mais prazerosas.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista que causa infecções severas em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com fibrose cística. Alguns candidatos vacinais para prevenir infecções causadas por *P. aeruginosa* já foram testados, porém ainda não está disponível no mercado nenhuma vacina contra esse patógeno. Nanopartículas (NPs) poliméricas biodegradáveis podem ter atividade adjuvante, de modo que se apresentam como candidatos promissores para a produção de vacinas se associadas aos antígenos vacinais. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial das NPs de albumina sérica bovina (BSA) associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em induzir proteção contra a infecção utilizando a cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14 em modelo murino. NPs de BSA associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e NPs vazias foram utilizadas para a análise da taxa de captura e para a avaliação da citotoxicidade, empregando células RAW 264.7 e BHK-21. Para análise da imunogenicidade das NPs, camundongos *Swiss* foram imunizados com NPs associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) ou NPs vazias. Como controle positivo e negativo, grupos de animais foram imunizados com antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e solução salina tamponada, respectivamente. A produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA foi avaliada por meio de ELISA. Em seguida, foi caracterizada a infecção pela *P. aeruginosa* PA14 nos animais imunizados com as NPs, avaliando-se a sobrevivência dos animais após a infecção, a carga bacteriana nos pulmões, a produção de citocinas e parâmetros histopatológicos. Verificou-se que os animais imunizados com NPPa apresentaram produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA. Após a infecção com a *P. aeruginosa* PA14, observou-se que os animais imunizados com NPPa foram os que apresentaram a maior porcentagem de sobrevivência, a menor carga bacteriana pulmonar, a produção mais controlada de citocinas e poucas alterações histopatológicas. Esses resultados indicam que as imunizações com NPPa protegeram os camundongos da infecção, contribuindo para a eliminação da bactéria dos pulmões, o que consequentemente refletiu na sobrevivência dos animais.

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Nanopartículas. Albumina Sérica Bovina. Vacina.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes severe infections in immunocompromised individuals and in patients with cystic fibrosis. Vaccine candidates to prevent infections caused by *P. aeruginosa* have already been tested, but no vaccine against this pathogen is available on the market. Biodegradable polymeric nanoparticles may have adjuvant activity. Therefore, they are promising candidates for the production of vaccines if associated to antigens. The objective of this study was to evaluate the potential of bovine serum albumin (NPs-BSA) associated with total *P. aeruginosa* ATCC 27853 antigens in inducing protection against the virulent *P. aeruginosa* PA14 strain in murine model of nasal infection. NPs-BSA associated with the total *P. aeruginosa* ATCC 27853 antigens and empty nanoparticles (NPs), were used for the uptake analysis and in cytotoxicity assay, employing RAW 264.7 and BHK-21 cells. For the immunogenicity analysis of NPs, Swiss mice were immunized with NPs associated with total *P. aeruginosa* antigens (NPPa) or empty NPs. As positive and negative control, groups of animals were immunized with total antigens of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and phosphate buffered saline, respectively. The production of anti-*P. aeruginosa* and anti-BSA antibodies was evaluated by ELISA. Immunized mice were infected via nasal route using *P. aeruginosa* PA14 strain. The survival after 48 hours was evaluated and the lungs from animals were processed for quantification of bacterial load, cytokine expression and also for histopathological analysis. It was seen that the animals immunized with NPPa produced anti-*P. aeruginosa* and anti-BSA IgG antibodies. After infection with *P. aeruginosa* PA14, it was observed that the animals immunized with NPPa had the highest percentage of survival, the lowest bacterial lung load, a controlled production of cytokines and few histopathological changes. These results indicate that NPPa immunizations protected the mice from infection, contributing for the elimination of the bacteria from the lungs, which consequently reflected the survival of the animals.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*. Nanoparticles. Bovine Serum Albumin. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem esquemática com os principais fatores de virulência produzidos pela *P. aeruginosa* 21
- Figura 2 - Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas..... 34
- Figura 3 - Internalização das nanopartículas (NPs) pela célula dendrítica (DC) 37
- Figura 4 - Preparo de nanoesferas de albumina pela técnica de coacervação 42
- Figura 5 - Perfil eletroforético obtido pela separação das proteínas de *P. aeruginosa* ATCC 2853 por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) 54
- Figura 6 - Caracterização morfológica por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM) das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) produzidas..... 55
- Figura 7 - Taxa de captura das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) fluorescentes por células RAW 264.7 e BHK-21 56
- Figura 8 - Imagens representativas obtidas por meio de microscopia de fluorescência das células BHK-21 e RAW 264.7 incubadas com as nanopartículas (NPs) fluorescentes 57
- Figura 9 - Avaliação do potencial citotóxico das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) produzidas e também da das proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) utilizando células BHK-21 e RAW 264.7 58
- Figura 10 - Produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA em camundongos imunizados com tampão fosfato salina (PBS), com nanopartículas vazias (NPV), com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) ou com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) 59
- Figura 11 - Curva de sobrevivência dos animais imunizados com tampão fosfato salina (PBS) (n=5), com nanopartículas vazias (NPV) (n=14), com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) (n=8) ou com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) (n=14), e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14, dentro de 48 horas 61
- Figura 12 - Carga bacteriana nos pulmões dos animais que foram imunizados com tampão fosfato salina (PBS) (n=5), com nanopartículas vazias (NPV)

(n=10), proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) (n=5) ou com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) (n=9), e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14 62

Figura 13 - Produção de citocinas nos pulmões de camundongos imunizados com tampão fosfato salina (PBS), com nanopartículas vazias (NPV), com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *aeruginosa* (NPPa) ou com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14..... 64

Figura 14 - Análise histopatológica dos pulmões esquerdos de camundongos imunizados com tampão fosfato salina (PBS), com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa), com nanopartículas vazias (NPV) ou com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetro médio, potencial Zeta e índice de polidispersão das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) obtidos pela técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Laser Doppler	55
Tabela 2 - Título dos anticorpos IgG anti- <i>P. aeruginosa</i> e anti-BSA detectados nos soros dos animais imunizados	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	- Microscopia de Força Atômica
AIDS	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
AnfB	- Anfotericina B
APC	- Célula apresentadora de antígenos
BCA	- Ácido bicinconínico
BSA	- Albumina sérica bovina
°C	- Graus Celcius
CC	- Controle de células
CC₅₀	- Concentração citotóxica para 50% das células
CDC	- Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CFTR	- Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística
Da	- Dalton
DC	- Célula dendrítica
DENV	- <i>Dengue virus</i>
DLS	- Dispersão Dinâmica de Luz
DMEM	- Meio Essencial Mínimo Modificado por Dulbecco
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
D.O.	- Densidade Óptica
ELISA	- Ensaio de Imunoadsorção Enzimática
EMA	- European Medicines Agency
EUA	- Estados Unidos da América
ExoS	- Exoenzima S
ExoT	- Exoenzima T
ExoU	- Exoenzima U
ExoY	- Exoenzima Y
FC	- Fibrose cística
Fc	- Fragmento cristalizável das imunoglobulinas
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
g	- Força g
h	- Horas
HBsAg	- Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HSA	- Albumina sérica humana
IATS	- Esquema Internacional de Tipificação Antigênica
IFN	- Interferon
IgA	- Imunoglobulina A
IgG	- Imunoglobulina G
IgG1	- Imunoglobulina G 1
IgG2a	- Imunoglobulina G 2a
IL	- Interleucina
kDa	- Kilodalton
LB	- Luria Bertani
LPS	- Lipopolissacarídeo
M	- Molar
mg	- Miligrama
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
mm	- Milímetros
MN	- Leucócitos mononucleares
MTT	- 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
mV	- Milivolts
m/v	- Massa sobre volume
MYSTIC	- Coleta de Informações de Teste de Suscetibilidade Anual de Meropenem
NI	- Não infectado
nm	- Nanômetro
NP	- Nanopartícula
NPPa	- NPs associadas aos antígenos totais de <i>P. aeruginosa</i>
NPV	- NPs contendo apenas BSA
OPD	- Dicloridrato de O-Fenilenodiamina
Opr	- Proteína de membrana externa
PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAPI	- Ilha de patogenicidade da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAV	- Pneumonia associada à ventilação
PBS	- Tampão fosfato salina
PBS-T	- PBS contendo 0,05% de Tween 20

P/E	- Penicilina/Estreptomicina
PGA	- Poli (ácido glicólico)
pH	- Potencial hidrogeniônico
PLA	- Poli (ácido láctico)
PLGA	- Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PM	- Leucócitos polimorfonucleares
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPa	- Proteínas totais de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
PRR	- Receptor de reconhecimento de padrão
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
rpm	- Rotações por minuto
SCOPE	- Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SFB	- Soro fetal bovino
SpcU	- Chaperona específica de <i>Pseudomonas</i> para ExoU
T3SS	- Sistema de secreção tipo 3
Th1	- Célula T auxiliar 1
Th2	- Célula T auxiliar 2
Th17	- Célula T auxiliar 17
TLR	- Receptor semelhante ao Toll
TNF	- Fator de necrose tumoral
TT	- Toxóide tetânico
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µm	- Micrômetro
UFC	- Unidade formadora de colônia
USFDA	- U.S. Food and Drug Administration

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2	Fatores de virulência	19
2.3	Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.4	Resistência a antimicrobianos	24
2.5	Resposta imune contra a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.6	Imunoprofilaxia	29
2.7	Nanopartículas.....	33
2.7.1	Nanopartículas e resposta imunológica	36
2.7.2	Nanopartículas de albumina sérica.....	41
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo Geral	46
3.2	Objetivos Específicos.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Cepas bacterianas e condições de cultivo	47
4.2	Extração das proteínas totais	47
4.3	Preparo e caracterização das nanopartículas	48
4.4	Preparo de nanopartículas fluorescentes	48
4.5	Avaliação da taxa de captura em células RAW 264.7 e BHK-21	48
4.6	Avaliação da citotoxicidade	49
4.7	Protocolo de imunização	50
4.8	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para detecção e titulação de anticorpos IgG anti- <i>P. aeruginosa</i> e anti-BSA	50
4.9	Desafio dos animais imunizados.....	51
4.10	Determinação do número de unidades formadoras de colônia no pulmão dos animais infectados.....	52
4.11	Quantificação de citocinas no pulmão dos animais infectados.....	52
4.12	Histopatologia	52
4.13	Análises estatísticas	53
5	RESULTADOS	54
6	DISCUSSÃO	67

7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, extracelular, em forma de bacilo, pertencente à família Pseudomonadaceae (BROOKS; CARROLL, 2009; POLLACK, 2000). Esse patógeno é capaz de colonizar e infectar diferentes hospedeiros, como animais, insetos, plantas e nematódeos (MAHAJAN-MIKLOS; RAHME; AUSUBEL, 2000). A *P. aeruginosa* está amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo e na água, assim como na microbiota intestinal e na pele dos seres humanos (BROOKS; CARROLL, 2009; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Também pode ser isolada de ambientes abióticos, tais como instalações hospitalares não estéreis, principalmente do piso, pias e equipamentos (CHITKARA; FEIERABEND, 1981 apud LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

Essa bactéria é considerada um patógeno oportunista, acometendo em grande parte pacientes com grandes queimaduras, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), leucemia e fibrose cística (FC) (POTTINGER; RELLER; RYAN, 2014). As infecções hospitalares tendo a *P. aeruginosa* como agente etiológico são comuns, principalmente para os indivíduos imunocomprometidos, uma vez que esses pacientes geralmente se encontram hospitalizados e expostos aos locais onde a bactéria pode ser encontrada (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Cerca de 10 a 15% dos casos de infecções hospitalares são causadas por essa bactéria (GRISHIN et al., 2015). A *P. aeruginosa* pode causar infecções na pele, no trato urinário, no trato respiratório, nos ouvidos, nos olhos, nos ossos e na corrente sanguínea (MESAROS et al., 2007).

As infecções causadas por essa bactéria são difíceis de serem tratadas e erradicadas, devido a sua resistência intrínseca a vários antibióticos, além de sua capacidade de adquirir resistência a eles (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Assim, estratégias de imunoprofilaxia para evitar a infecção pela *P. aeruginosa*, principalmente nas populações suscetíveis, são alternativas ideais frente à ineficiência do tratamento com antibióticos. Tentativas de se desenvolver vacinas contra a *P. aeruginosa* tendo como alvo diferentes estruturas e imunógenos foram feitas, porém ainda não foi possível a obtenção de uma vacina comercial (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

Assim, é crescente a busca por novas alternativas vacinais que sejam eficientes e seguras contra a infecção causada por essa bactéria. As nanopartículas (NPs) são utilizadas como sistemas de entrega de fármacos ou de outros compostos como peptídeos, proteínas recombinantes e antígenos vacinais (MARCATO; DURÁN, 2008). O antígeno vacinal pode

ser ligado ou encapsulado à matriz da NP, de modo que as NPs fornecem proteção ao antígeno contra a degradação e ainda permitem a sua liberação controlada (MARCATO; DURÁN, 2008; SOPPIMATH et al., 2001). Materiais como polímeros, copolímeros e lipídeos, podem ser empregados no preparo de NPs como sistema de entrega de vacinas (OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010). Dentre esses polímeros, pode ser citada a proteína albumina, a qual é biodegradável, biocompatível, fácil de purificar, estável e hidrofílica, sendo assim um candidato atraente para a produção de NPs biodegradáveis (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; RAHIMNEJAD; JAHANSHAHI; NAJAFPOUR, 2006).

NPs poliméricas biodegradáveis associadas a antígenos vacinais apresentam potencial adjuvante, direcionam a entrega do antígeno para células apresentadoras de antígenos (APCs), e mantém o antígeno intacto por mais tempo, aumentando assim a oportunidade para a sua captura e processamento pelas APCs (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa já demonstraram a eficácia de NPs de albumina sérica bovina (BSA) associadas com o *Dengue virus* (DENV) inativado ou com antígenos totais de *P. aeruginosa*, em induzir a produção de anticorpos específicos contra estes micro-organismos (RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012). Foi também demonstrado que os camundongos imunizados com as NPs associadas aos antígenos de *P. aeruginosa* mostraram menor grau de inflamação pulmonar, após desafio com cepa não virulenta de *P. aeruginosa* (RODRIGUES et al., 2013). Dessa forma, esta pesquisa tem como foco continuar o processo de validação das NPs de BSA como sistemas vacinais para prevenir infecções causadas por *P. aeruginosa*, avaliando a eficácia dessas NPs associadas aos antígenos de *P. aeruginosa* em induzir proteção contra o desafio com cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Após extensa revisão da literatura, neste tópico será feita uma exposição detalhada dos diversos temas abordados neste trabalho.

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O micro-organismo *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, extracelular, em forma de bacilo, medindo em torno de 0,6 x 2 µm (BROOKS; CARROLL, 2009). Essa bactéria pertence à família Pseudomonadaceae, sendo que o gênero *Pseudomonas* apresenta 144 espécies (GOMILA et al., 2015). Ela pode ser encontrada isolada, aos pares (diplobacilos), e eventualmente em cadeias curtas (estreptobacilos) (BROOKS; CARROLL, 2009). Há diversas espécies do gênero *Pseudomonas*, sendo que a mais importante do ponto de vista médico é a *P. aeruginosa* (POTTINGER; RELLER; RYAN, 2014). Além de infectar animais, várias cepas dessa bactéria, como a UCBPP-PA14 (PA14), são capazes de colonizar plantas, insetos e até mesmo nematódeos (BULLA, 1975; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; MAHAJAN-MIKLOS; RAHME; AUSUBEL, 2000; RAHME et al., 1995).

Essa bactéria é ubiqüitária, ou seja, está amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo e na água. Ela também pode ser encontrada na microbiota intestinal e na pele dos seres humanos, situação na qual atua como saprófita (BROOKS; CARROLL, 2009). A *P. aeruginosa* pode ser isolada da garganta e fezes de cerca de 2 a 10% dos indivíduos saudáveis (POTTINGER; RELLER; RYAN, 2014). Também pode ser isolada de ambientes abióticos, como instalações hospitalares não estéreis, principalmente do piso, pias e equipamentos (ex.: ventiladores mecânicos e cateteres urinários), além de poder ser encontrada nas mãos dos profissionais de saúde (CHITKARA; FEIERABEND, 1981 apud LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). A vasta presença desse micro-organismo em diversos ambientes pode ser explicada pelas suas exigências nutricionais mínimas, pela presença de mecanismos que o tornam resistente a antimicrobianos e também pela sua capacidade de se adaptar a condições físicas distintas (GALES et al., 2001).

A *P. aeruginosa* vive em condições aeróbicas e a sua mobilidade se deve pela presença de um único flagelo polar. É não fermentadora e pode utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos para obter energia. Dentre eles se encontram a glicose e outros carboidratos, os quais são metabolizados por uma via de oxidação. Essa bactéria apresenta um

crescimento satisfatório na faixa de 37 a 42 °C (BROOKS; CARROLL, 2009; PITT; SIMPSON, 2006).

De acordo com o Esquema Internacional de Tipificação Antigênica (IATS), as cepas de *P. aeruginosa* podem ser classificadas em 20 sorotipos diferentes (O1 a O20), baseado nas variações da estrutura química do antígeno O presente no lipopolissacarídeo (LPS) (KING et al., 2009).

Algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem uma camada de polissacarídeo externamente à parede celular, também conhecida como polissacarídeo capsular. Essa cápsula é formada pela síntese e secreção do alginato, e auxilia na adesão da bactéria ao hospedeiro (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008; POLLACK, 1984; POTTINGER; RELLER; RYAN, 2014).

Uma característica marcante dessa espécie é a produção de pigmentos. Dentre esses pigmentos, os mais comumente produzidos são a piocianina (presente somente em *P. aeruginosa*), a qual apresenta uma coloração azulada não fluorescente e a pioverdina ou fluoresceína, um pigmento amarelo fluorescente sob a luz ultravioleta. Os dois pigmentos juntos são responsáveis pela cor azul-esverdeada, a qual é característica dos meios de cultura contendo esse organismo (BROOKS; CARROLL, 2009; PITT; SIMPSON, 2006).

A *P. aeruginosa* apresenta seu material genético arranjado em um cromossomo único, circular, contínuo e de dupla fita (STOVER et al., 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Quando se traça um paralelo entre o genoma da *P. aeruginosa* com o de outras bactérias, nota-se que ele é um dos maiores, com cerca de 6,3 milhões de pares de bases e aproximadamente 6000 genes (RAU et al., 2010; STOVER et al., 2000).

Após o sequenciamento de diversas cepas, observou-se que o genoma dessa bactéria apresenta um conjunto de genes conservados, o qual é interrompido por combinações de genes característicos de cada cepa (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Esses segmentos contendo os genes característicos são conhecidos como regiões de plasticidade genômica, os quais podem ter sido obtidos por transferência horizontal (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MATHEE et al., 2008; SILBY et al., 2011). Sendo assim, o genoma principal corresponde a 90% do genoma, enquanto que os genes específicos das diferentes cepas, os quais estão presentes no genoma “acessório”, correspondem a 10% do genoma (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Além disso, a *P. aeruginosa* possui uma quantidade grande de genes regulatórios, cerca de 521, uma quantidade muito maior do que a encontrada em outros genomas bacterianos já sequenciados (STOVER et al., 2000). A complexidade e o tamanho

de seu genoma, permitem à *P. aeruginosa* ser um organismo ubíquo, infectar diferentes tecidos e ser resistente a muitos antimicrobianos (MESAROS et al., 2007).

Essa bactéria é representada por diversas cepas com virulências distintas, variando desde cepas não virulentas ou com virulência moderada até cepas extremamente virulentas (MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011). A cepa PA14, a qual apresenta alta virulência, possui duas ilhas de patogenicidade em seu genoma, PAPI-1 e PAPI-2, com 108 kb e 11 kb, respectivamente, as quais estão ausentes na cepa pouco virulenta PAO1. Essas ilhas possuem genes que podem codificar fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade dessa cepa. PAPI-1 carrega genes que codificam fatores de virulência, tais como os genes do grupo B pili tipo IV, os quais estão envolvidos com fatores de virulência que permitem a fixação do patógeno às células do hospedeiro. PAPI-2 possui o gene que codifica a proteína efetora patogênica Exoenzima U (ExoU) e a chaperona específica de *Pseudomonas* para ExoU (SpcU). ExoU faz parte do sistema de secreção tipo 3 (T3SS) e é considerada uma das proteínas mais potentes desse sistema (HE et al., 2004; SATO et al., 2003). Já a *P. aeruginosa* ATCC 27853, é um exemplo de cepa não virulenta, ou seja, não é considerada patogênica nos modelos de infecção (RODRIGUES et al., 2013).

2.2 Fatores de virulência

A *P. aeruginosa* é invasiva e toxigênica, sendo capaz de produzir diversos fatores de virulência associados à sua superfície e/ou secretados, os quais permitem a invasão bacteriana, assim como podem causar lesão tecidual, o que contribui para o desenvolvimento da doença (MESAROS et al., 2007; PITT; SIMPSON, 2006).

Cada bactéria possui um flagelo único, localizado em um de seus pólos, e também filamentos menores e mais numerosos, classificados como pili tipo IV. Tanto os flagelos quanto os pili contribuem para a mobilidade da célula e para sua adesão no hospedeiro, pois são capazes de mediar a fixação da bactéria nas células epiteliais, e assim permitir a colonização das mucosas e pele, seguida de invasão e doença sistêmica (BROOKS; CARROLL, 2009; GELLATLY; HANCOCK, 2013). Outro fator de virulência importante é o T3SS, o qual permite a essa bactéria injetar proteínas patogênicas diretamente no citosol da célula eucariótica por meio de um poro formado na membrana plasmática da célula (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Essas proteínas são capazes de interferir nas vias de sinalização, e assim no funcionamento das células do hospedeiro, podendo levar à morte

celular, o que conseqüentemente facilita a infecção (HUECK, 1998). As proteínas efetoras patogênicas identificadas até o momento são a ExoS, ExoU, ExoY e ExoT (HAUSER, 2009).

O LPS que faz parte da composição da membrana externa da parede celular dessas bactérias, é responsável em grande parte pela virulência dessa bactéria, pois funciona como uma barreira contra a ação de antibióticos e das defesas do organismo, medeia interações com as células hospedeiras e também funciona como uma endotoxina, levando a danos nos tecidos (KING et al., 2009).

Além dos fatores de virulência já citados, essa bactéria ainda é capaz de produzir outras substâncias que contribuem para o dano tecidual do hospedeiro. A *P. aeruginosa* pode produzir a elastase, a qual cliva IgG, IgA, colágeno e proteínas do complemento. A barreira epitelial pode ser rompida pela elastase, que desfaz as junções entre as células epiteliais. Outras enzimas produzidas por essa bactéria são as proteases alcalinas, as quais degradam anticorpos, proteínas do complemento e citocinas. As fosfolipases C, que são encontradas em quase todas as cepas, e lecitinasas, são hemolisinas. As fosfolipases C atuam destruindo fosfolipídeos da membrana das células do hospedeiro, enquanto que a lecitinase atua degradando a lecitina (PITT; SIMPSON, 2006; SADIKOT et al., 2005). Algumas cepas de *P. aeruginosa* sintetizam a exotoxina A, a qual inibe a síntese de proteínas, levando à morte celular e conseqüentemente à necrose (BROOKS; CARROLL, 2009; GELLATLY; HANCOCK, 2013). O pigmento piocianina que é sintetizado por muitas cepas da *P. aeruginosa* também é um fator de virulência importante. A piocianina é capaz de provocar estresse oxidativo ao hospedeiro, além de inativar a catalase (MALLEY et al., 2003; SADIKOT et al., 2005). Um dos principais efeitos da piocianina no organismo hospedeiro é a sua capacidade de induzir os neutrófilos à apoptose, suprimindo assim a resposta inflamatória, o que é oportuno para a sobrevivência bacteriana (ALLEN et al., 2005). Outro pigmento produzido por essa bactéria, a pioverdina, atua como um sideróforo, ou seja, um composto que atua na captação de ferro, o qual é importante para o metabolismo bacteriano (PITT; SIMPSON, 2006) (FIGURA 1).

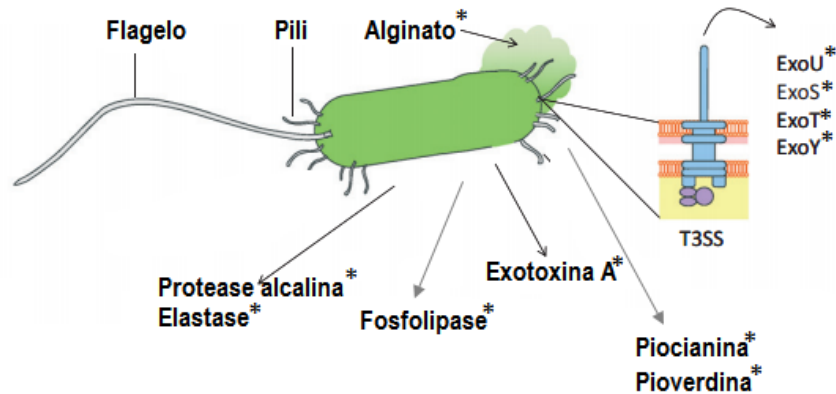


Figura 1- Imagem esquemática com os principais fatores de virulência produzidos pela *P. aeruginosa*. * indica fatores de virulência secretados.

Fonte: Adaptado de Gellatly e Hancock (2013, p.163).

2.3 Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é responsável por uma ampla gama de infecções agudas e crônicas, sendo capaz de infectar qualquer tecido (LAVOIE; WANGDI; KAZMIERCZAK, 2011; LYCZAK; CANNON; PIER, 2000). Os sinais e sintomas observados durante a infecção variam de acordo com o local do organismo em que a bactéria está presente, e geralmente não são exclusivos desse patógeno (POTTINGER; RELLER; RYAN, 2014).

Essa bactéria raramente irá causar infecções em indivíduos saudáveis, acometendo em grande parte aqueles que apresentam alguma fragilidade ou comprometimento nas defesas do organismo, conferindo à *P. aeruginosa* uma característica de patógeno oportunista (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; POTTINGER; RELLER; RYAN, 2014). Assim, a *P. aeruginosa* é capaz de colonizar e infectar principalmente indivíduos com queimaduras, leucemia, AIDS, que passaram por transplante de órgãos e com FC (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

A *P. aeruginosa* é um dos patógenos hospitalares mais comuns nos Estados Unidos (EUA) (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Estudos realizados entre 2006 e 2007 nos EUA, mostraram que a *P. aeruginosa* foi o segundo patógeno mais frequentemente isolado de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (HIDRON et al., 2008). Dados do SENTRY – Programa de Vigilância da Resistência Antimicrobiana, recolhidos entre 2009 e 2012 em 28 centros médicos dos EUA, e 25 centros médicos da Europa, revelaram que a *P. aeruginosa* foi a bactéria gram negativa mais frequentemente isolada de indivíduos hospitalizados com pneumonia, sendo responsável por 20,9% dos casos tanto nos EUA quanto na Europa (SADER et al., 2014). Dados do Centro de Controle e Prevenção de

Doenças (CDC) dos EUA atualizados em 2014, mostraram que cerca de 51000 casos de infecção por *P. aeruginosa* associadas a tratamentos de saúde ocorrem a cada ano, sendo que mais de 6000 (13%) destas infecções são causadas por cepas multirresistentes (VENTOLA, 2015).

Assim como nos EUA, a *P. aeruginosa* é um importante patógeno hospitalar no Brasil. Um estudo realizado em 2003 pelo programa Coleta de Informações de Teste de Suscetibilidade Anual de Meropenem (MYSTIC), coletou amostras de bactérias gram-negativas responsáveis por infecções nosocomiais em 20 centros médicos brasileiros. A *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequentemente encontrado, correspondendo a 30,3% dos isolados (KIFFER et al., 2005). Dados do projeto de Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica (SCOPE) do Brasil obtidos entre 2007 e 2010 de 16 hospitais, foram utilizados para se estudar os casos de infecções nosocomiais da corrente sanguínea. Dessas infecções, 90% eram monomicrobianas, ou seja, causadas por apenas um tipo de micro-organismo, sendo que a *P. aeruginosa* foi o 5º patógeno mais comumente isolado das infecções (MARRA et al., 2011). Um outro estudo utilizando dados do SENTRY coletados entre 2008 e 2010 em 10 hospitais localizados na Argentina, Brasil, Chile e México, investigou a frequência e resistência de bactérias isoladas de pacientes hospitalizados com infecções adquiridas em comunidade ou nos hospitais. Os resultados mostraram que a *P. aeruginosa* é o patógeno mais frequentemente isolado de pneumonias, correspondendo a 31,2% dos isolados (GALES et al., 2012).

Essa bactéria raramente é responsável por infecções em pacientes saudáveis, exceto se introduzida nos tecidos em altas concentrações, como em casos de acidentes laboratoriais e em hospitais, devido à intubação. Essa bactéria pode causar infecções pulmonares agudas e crônicas. Além disso, esse micro-organismo pode ser responsável por infecções de pele após perfurações. Também pode causar otite externa, infecção esta conhecida como “orelha de nadador”, resultado do acúmulo de água no canal auditivo e lesão tecidual (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MESAROS et al., 2007). Infecções oftálmicas por essa bactéria também podem ocorrer, visto que esse micro-organismo tem a capacidade de infectar a córnea, produzindo ceratite ou ulceração. A infecção ocular geralmente ocorre após lesão ou procedimento cirúrgico, e dentre as fontes de bactéria estão medicamentos oculares e soluções para lentes de contato que se encontram contaminados. Do mesmo modo, queimaduras podem ser alvo de infecção pela *P. aeruginosa*, a qual geralmente é oriunda do ambiente externo ou da microbiota do indivíduo. Assim como é capaz de ser isolada de queimaduras, essa bactéria também pode ser encontrada em feridas, bem como nos ossos, após perfurações (BROOKS;

CARROLL, 2009; MESAROS et al., 2007; PITT; SIMPSON, 2006). O trato urinário também pode ser alvo desta bactéria, e essa infecção geralmente tem origem em hospitais e se deve ao uso de cateter urinário. A *P. aeruginosa* também pode acometer a corrente sanguínea, gerando bacteremia e septicemia. As principais fontes de bacteremia incluem a pele, trato gastrointestinal e respiratório. Infecções do sistema nervoso central e do sistema digestivo causadas pela *P. aeruginosa* são raras (MESAROS et al., 2007; PITT; SIMPSON, 2006).

Essa bactéria é um dos principais responsáveis por infecções pulmonares em pacientes hospitalizados. A pneumonia causada pela *P. aeruginosa* pode ser adquirida em hospitais ou em comunidade, embora a sua aquisição em comunidade seja incomum e esteja relacionada com algum comprometimento imunológico (GELLATLY; HANCOCK, 2013). As pneumonias hospitalares agudas são com frequência resultado de lesão devido à intubação, e por isso também são chamadas de pneumonias associadas à ventilação (PAV). Nos pacientes com esse tipo de infecção, ocorre a lesão da traqueia pela inserção do tubo endotraqueal, o qual além de causar rompimento da defesa física, pode servir de reservatório para a bactéria (GELLATLY; HANCOCK, 2013; GIL-PEROTIN et al., 2012; SAFDAR; CRNICH; MAKI, 2005). Já as pneumonias crônicas são a evolução de infecções agudas não eliminadas, onde a *P. aeruginosa* se adapta às condições fisiológicas dos pulmões e cresce na forma de biofilmes (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Essa infecção ocorre sobretudo em indivíduos com FC, sendo que durante o curso da infecção, a bactéria passa por uma transição, do fenótipo não-mucoide para o mucoide, o qual é caracterizado pela superexpressão do alginato, um polissacarídeo extracelular (BRAGONZI et al., 2005). Essa conversão do fenótipo não-mucoide para o mucoide pode ocorrer devido à exposição da bactéria a espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, produzido pelos neutrófilos recrutados para o sítio da infecção (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010).

A FC é uma doença autossômica recessiva hereditária causada por mutações no gene regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR). Essa doença pode afetar o funcionamento de diversos órgãos e sistemas, tais como os pulmões, pâncreas e sistema digestivo (FOLKESSON et al., 2012; SOUSA; PEREIRA, 2014). Essas mutações levam a um mal funcionamento do CFTR, um canal para o transporte de íons cloreto presente nas células epiteliais, o que gera uma diminuição no volume do fluido na superfície das células epiteliais das vias aéreas e assim uma redução na eliminação dos patógenos inalados pelo mecanismo mucociliar (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010; SOUSA; PEREIRA, 2014). Uma vez estabelecida, a *P. aeruginosa* pode crescer na forma de biofilme no trato respiratório, biofilme este composto principalmente do exopolissacarídeo alginato, produzido pelas bactérias com

fenótipo mucoide. O biofilme bacteriano é extremamente resistente à fagocitose e a outros componentes, tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida e também a antibióticos (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010). Dessa forma, os indivíduos com FC que se tornam infectados pela bactéria, podem permanecer por muitos anos, ou até mesmo durante toda a vida com uma infecção pulmonar (GELLATLY; HANCOCK, 2013; HØIBY; FREDERIKSEN; PRESSLER, 2005). Como consequência, a infecção pulmonar crônica causada pela *P. aeruginosa* é a principal responsável pela morbidade e mortalidade de pacientes com CF, dado à disfunção pulmonar (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010; LYCZAK; CANNON; PIER, 2000).

2.4 Resistência a antimicrobianos

Uma vez estabelecida a infecção por esse patógeno, a sua erradicação é um desafio para os sistemas de saúde, visto a sua capacidade intrínseca de resistir a muitos tipos de antibióticos, além de ser capaz de adquirir resistência a eles. Assim, a *P. aeruginosa* pode apresentar resistência intrínseca, adquirida e adaptativa aos agentes antimicrobianos (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A resistência intrínseca é codificada pelo cromossomo bacteriano, e pode ser representada pela baixa permeabilidade da membrana externa, pela presença de bombas de efluxo e também pela síntese de β -lactamase (GELLATLY; HANCOCK, 2013). A membrana externa da parede celular dessas bactérias constitui um bloqueio para a entrada de moléculas hidrofílicas, como antibióticos β -lactâmicos, já que o transporte dessas substâncias é restrito aos canais de proteínas porinas embebidas na membrana. Essa baixa permeabilidade pode ser ilustrada pelo fato de a membrana externa da *P. aeruginosa* ser de 12 a 100 vezes menos permeável do que a membrana de *Escherichia coli* (GELLATLY; HANCOCK, 2013; HANCOCK, 1998). Muitos canais de porina formados pela proteína de membrana externa F (OprF) são pequenos, assim como os canais formados pelas OprD e OprB, o que acaba acarretando em uma grande exclusão das moléculas de antibióticos, que não são então captadas (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011).

Além da reduzida permeabilidade da membrana externa dessa bactéria, a *P. aeruginosa* também exhibe bombas de efluxo, as quais ejetam drogas para fora da célula. Essas bombas podem ser formadas por componentes únicos ou por vários componentes. Os sistemas de bomba com vários componentes possuem um transportador na membrana plasmática, assim como um canal na membrana externa, além de uma proteína adaptadora no espaço

periplásmico, a qual une os outros dois componentes. Esse arranjo permite a expulsão de moléculas ao longo das duas membranas (MESAROS et al., 2007; SUN; DENG; YAN, 2014).

O terceiro mecanismo intrínseco de resistência da *P. aeruginosa* se baseia na produção de β -lactamase. Essa enzima após sintetizada fica armazenada no espaço periplásmico, e normalmente é detectada em baixas concentrações, porém a presença de determinados níveis de β -lactâmicos induz sua maior expressão (GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A resistência adquirida é caracterizada pela transferência horizontal de elementos genéticos, e também por mutações. A transferência horizontal pode ocorrer por meio da conjugação, transformação ou transdução de plasmídeos, transposons, integrons, entre outros elementos genéticos que possuam genes que codifiquem proteínas que confirmam resistência a antibióticos. As mutações podem levar à ampliação dos mecanismos de resistência intrínseca, podendo ocorrer em diferentes genes, provocando diminuição da captura de moléculas de antibiótico, superexpressão de bombas de efluxo, aumento na síntese de β -lactamase e formação de alvos alterados para os antibióticos (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011).

A resistência adaptativa se dá quando as células bacterianas são expostas a algum estresse ambiental, como a presença de antibióticos e estados de crescimento, como a formação de biofilmes. Essas situações podem levar a modificações na expressão gênica, como o aumento da transcrição de genes que conferem resistência, acarretando em mudanças nas bombas de efluxo, na expressão de enzimas e no envelope celular (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Assim, para ser mais efetivo, o tratamento contra a infecção causada por essa bactéria se baseia na combinação de drogas, como um antibiótico β -lactâmico juntamente com uma fluoroquinolona ou aminoglicosídeo. Porém, como a *P. aeruginosa* é capaz de adquirir resistência, novos antimicrobianos devem ser continuamente produzidos, o que acaba se tornando um desafio muitas vezes inatingível para a indústria farmacêutica (MESAROS et al., 2007).

2.5 Resposta imune contra a *Pseudomonas aeruginosa*

As primeiras células de defesa a entrarem em contato e a reconhecerem a *P. aeruginosa* durante uma infecção pulmonar são os macrófagos alveolares. Além de suas funções fagocíticas, essas células são muito importantes na detecção da *P. aeruginosa* durante

infecções. Um estudo *in vitro* demonstrou a capacidade de macrófagos ativados em secretar citocinas, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) após o reconhecimento de flagelina, proteína do flagelo, e do LPS da *P. aeruginosa* pelos receptores semelhantes ao Toll 5 (TLR-5) e TLR-4, respectivamente (RAOUST et al., 2009). Hashimoto et al. (1996) depletaram macrófagos alveolares de ratos, e em seguida, administraram a *P. aeruginosa* no trato respiratório. Eles verificaram um número baixo de neutrófilos no tecido pulmonar, e também baixa produção de substâncias envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos. Em um outro estudo, Kooguchi et al. (1998) observaram que camundongos deficientes em macrófagos alveolares apresentavam maior carga bacteriana, menor recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação e maior lesão tecidual após 48 horas de infecção pulmonar com a *P. aeruginosa*.

Uma vez estabelecida a infecção pela *P. aeruginosa* nos pulmões, ocorre o recrutamento massivo de neutrófilos do sangue para os tecidos infectados. Essas células são extremamente importantes na eliminação da *P. aeruginosa* durante infecções pulmonares agudas, de acordo com Lavoie, Wangdi e Kazmierczak (2011), o que pode ser comprovado pela suscetibilidade de camundongos a doses baixas de *P. aeruginosa* após a depleção de neutrófilos (KOH et al., 2009). Entretanto, apesar de essas células serem importantes no combate à infecção, quando são ativados por citocinas pró-inflamatórias ou pelo reconhecimento do LPS da bactéria, podem degranular massivamente causando grande lesão tecidual (WILLIAMS; PARKOS, 2007). A *P. aeruginosa* estimula de maneira persistente o sistema imunológico durante infecções crônicas, de modo que a resposta dos neutrófilos também é persistente, porém ineficiente em eliminar a bactéria. Devido à degranulação crônica desencadeada pelos neutrófilos, é observada uma extensa lesão pulmonar nos indivíduos com FC (GELLATLY; HANCOCK, 2013; WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

Em um modelo de infecção pós-sepse, Pène et al. (2008) investigaram a contribuição das células dendríticas (DCs) para a defesa dos pulmões em um modelo de sepse polimicrobiana subletal seguida da infecção pulmonar com a *P. aeruginosa*. Verificou-se que a sepse afetou as funções de DCs derivadas de medula óssea dos camundongos, e aumentou a suscetibilidade dos animais à pneumonia causada pela *P. aeruginosa*. A administração de DCs derivadas de medula óssea de camundongos do grupo controle, os quais não passaram por sepse, aumentou a sobrevivência dos animais à infecção com a *P. aeruginosa*. Esses resultados destacam a importância das DCs na elaboração de uma resposta imune eficiente nos pulmões.

Outro componente importante da imunidade inata no combate à *P. aeruginosa* é o sistema complemento. O complemento é necessário para a defesa do hospedeiro contra a infecção pulmonar causada pela *P. aeruginosa* em camundongos. Younger et al. (2003) verificaram que uma cepa de *P. aeruginosa* foi resistente à morte pelo soro murino *in vitro*, mas que ocorreu a opsonização por C3b e a montagem da C5 convertase na sua superfície. *In vivo*, verificou-se que animais deficientes no complemento, apresentaram maior mortalidade do que os animais do grupo controle após a infecção intratraqueal com a *P. aeruginosa*.

Citocinas também mediam eventos importantes durante a resposta imune inata a essa bactéria. Gosselin et al. (1995) demonstraram que a presença de TNF- α é essencial para o combate à infecção causada por essa bactéria em modelo animal de infecção pulmonar crônica. Esses pesquisadores trataram camundongos BALB/c resistentes à infecção com anticorpos monoclonais anti-TNF- α e observaram que houve um aumento nos níveis de bactéria nos pulmões dos animais 3 dias após a infecção com uma cepa mucoide imobilizada em grânulos de ágar.

Após o desencadeamento da resposta imune inata, inicia-se a resposta imune adquirida. Pelo fato de a *P. aeruginosa* ser uma bactéria extracelular, a resposta humoral, ou seja, dos anticorpos, é muito mais eficiente em evitar a colonização e infecção pela bactéria (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

Dunkley et al. (2003) investigaram o papel de anticorpos IgG específicos contra a *P. aeruginosa*, na proteção contra a bactéria em um modelo de infecção pulmonar aguda. Verificou-se que os animais que receberam anticorpos IgG imune (obtidos de animais previamente imunizados com a bactéria) apresentaram maior eliminação da bactéria no lavado broncoalveolar após a infecção intratraqueal, do que se comparado com os animais que receberam anticorpos IgG não imune.

No caso particular de paciente com FC com infecção bacteriana crônica, os anticorpos produzidos após a infecção não oferecem proteção ao paciente. Ao invés disso, o aumento nos níveis de anticorpos anti-*P. aeruginosa* é prejudicial e se relaciona com um pior prognóstico (HØIBY, 2001). Mesmo em altos níveis durante infecções crônicas, os anticorpos não são eficientes, pois possuem baixa atividade opsonizante (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Além disso, as bactérias que crescem nos pulmões de pacientes com FC se apresentam em biofilmes, o que torna as células resistentes à opsonização (MELULENI et al., 1995). A presença do biofilme faz com que os anticorpos se liguem a antígenos bacterianos próximos à superfície do biofilme. Isso leva à formação de imunocomplexos e consequentemente à ativação do complemento e ao recrutamento de células fagocíticas polimorfonucleares, o que

caracteriza o estabelecimento de um processo inflamatório neutrofílico. A tentativa ineficiente de fagocitose ao redor do biofilme por parte dos neutrófilos acaba gerando a liberação de elastase e ROS, evento que promove a lesão dos pulmões dos pacientes com FC (HØIBY, 2001; HØIBY et al., 2001). Assim, a inflamação crônica que se estabelece nos pulmões de pacientes com FC é a principal responsável pelo dano tecidual. Apesar do intenso tratamento com antibióticos e do estabelecimento do processo inflamatório, a infecção bacteriana persiste. O dano tecidual vai se acumulando ao longo dos anos, conseqüentemente ocorre a disfunção pulmonar, o que leva à insuficiência respiratória, necessidade de transplante de pulmão e até mesmo à morte do paciente (HØIBY; CIOFU; BJARNSHOLT, 2010).

Apesar de a principal resposta da imunidade adquirida contra a *P. aeruginosa* ser a humoral, a imunidade celular mediada pelas células T também pode ser essencial em pacientes infectados pela bactéria (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Experimentos mostraram que linfócitos T podem conferir proteção a camundongos imunossuprimidos contra a infecção causada por *P. aeruginosa* mesmo na falta de anticorpos específicos, proteção essa baseada na eliminação da bactéria mediada pelas células T (POWDERLY; PIER; MARKHAM, 1986). Dunkley, Clancy e Cripps (1994), investigaram o papel de células T CD4 intestinais no combate à *P. aeruginosa* por meio de um modelo animal de infecção pulmonar com o patógeno. Para isso, os pesquisadores transferiram células oriundas de linfonodos mesentéricos de camundongos previamente imunizados oralmente com a *P. aeruginosa* para animais não imunizados, os quais foram em seguida infectados intra-traquealmente com bactérias vivas. Eles observaram que houve eliminação das bactérias dos pulmões dos animais desafiados com a bactéria.

Foi observado que é mais comum uma resposta do tipo Th2 em pacientes com FC que apresentavam infecção crônica com a *P. aeruginosa*. Além disso, verificou-se que os indivíduos cronicamente infectados que apresentavam as maiores produções de IFN- γ , também mostravam uma melhor função pulmonar. Isso indica que a mudança da resposta Th2 para Th1 poderia melhorar o prognóstico desses pacientes (MOSER et al., 2000). Da mesma forma, é importante citar que estudos de infecção crônica com essa bactéria em modelos animais, mostraram que os animais que apresentavam uma resposta do tipo Th1, tiveram menor inflamação pulmonar e maior eliminação da bactéria, do que se comparado com os animais que exibiam uma resposta de tipo Th2 (HARTL et al., 2006).

A citocina pró-inflamatória IFN- γ , que é uma citocina associada ao perfil Th1, pode ter papel protetor durante a infecção pulmonar causada pela *P. aeruginosa*. Johansen et al. (1996) verificaram a resposta de camundongos em um modelo de infecção crônica tratando-os

com IFN- γ recombinante antes e após a infecção com a bactéria. Observou-se que os animais tratados com a citocina recombinante após a infecção, mostraram uma redução na gravidade da inflamação pulmonar comparado com os animais tratados antes do desafio e com o grupo controle.

A citocina IL-4, um mediador inflamatório produzido por células Th2, pode ser benéfica na defesa do hospedeiro contra a *P. aeruginosa*. Jain-Vora et al. (1998) infectaram camundongos transgênicos que superexpressavam a citocina IL-4 e camundongos selvagens com uma cepa mucoide de *P. aeruginosa*, em um modelo de infecção aguda. Verificou-se que os animais transgênicos apresentaram maior sobrevivência e menor proliferação de bactérias nos pulmões, se comparado com o grupo controle.

Células Th17 podem ter uma participação importante no combate a infecções causadas por bactérias extracelulares, como a *P. aeruginosa*. Liu et al. (2011) avaliaram o papel da citocina IL-17 em um modelo animal de infecção pulmonar aguda causada pela *P. aeruginosa*. Após a infecção, foram detectados níveis elevados da proteína IL-17 nos pulmões dos animais infectados. Foi observado também que os camundongos que receberam anticorpos anti-IL-17 antes de serem infectados com a bactéria, apresentavam uma carga bacteriana pulmonar maior do que se comparado com os animais do grupo controle.

2.6 Imunoprofilaxia

A *P. aeruginosa* apresenta diversos mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência a antimicrobianos, o que torna o tratamento contra essa bactéria uma complicação séria (TENOVER, 2006). Pelo fato de o tratamento com antibióticos muitas vezes não ser uma estratégia eficaz, o ideal é a prevenção da infecção, e para isso é necessário que haja a vacinação. Muitas tentativas de se desenvolver vacinas contra a *P. aeruginosa* foram feitas, chegando inclusive na fase clínica de testes em humanos, porém características do patógeno e dos hospedeiros impediram o término e a comercialização de uma possível vacina (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

O LPS dessa bactéria é um dos antígenos vacinais mais investigados desde a década de 1960, em virtude de sua exposição superficial e de sua alta imunogenicidade. Porém o desenvolvimento de vacinas baseadas em LPS foi dificultado devido aos efeitos tóxicos do lipídeo A (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). A utilização apenas da porção de polissacarídeo O do LPS como um composto vacinal se mostrou uma alternativa interessante, visto a ausência de toxicidade. Entretanto, o polissacarídeo O é fracamente imunogênico,

além de ser um antígeno timo independente. Dessa forma, pesquisadores conjugaram covalentemente o polissacarídeo O à exotoxina A, com o objetivo de aumentar sua imunogenicidade. Além de aumentar a imunogenicidade do polissacarídeo O, a exotoxina A também é capaz de eliciar a produção de anticorpos, os quais podem ser importantes na indução de imunidade contra a *P. aeruginosa*. O candidato vacinal se mostrou seguro quando administrado em voluntários humanos, com ausência de efeitos sistêmicos. Também eliciu uma resposta imune humoral, com anticorpos IgG anti-polissacarídeo O e anti-exotoxina A. Os anticorpos anti-exotoxina A neutralizaram o potencial citotóxico da toxina, enquanto que os anticorpos anti-polissacarídeo O induziram a fagocitose e morte de uma dada cepa de *P. aeruginosa* por leucócitos polimorfonucleares com receptores Fc. Entretanto, devido à grande heterogeneidade do polissacarídeo O entre os diferentes sorotipos, um candidato vacinal baseado no conjugado descrito anteriormente teria de ser multivalente, a fim de ser efetivo contra vários sorotipos da bactéria (CRYZ et al., 1987; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Como conclusão, a utilização do LPS ou de seus derivados como candidato vacinal encontra diversos obstáculos, como a alta heterogeneidade, a toxicidade inerente ao LPS e o alto custo para o desenvolvimento de vacinas livres de lipídeo A conjugadas com outros componentes (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

Outra estrutura bacteriana que é alvo do desenvolvimento de vacinas é o flagelo, o qual contribui para a mobilidade da célula e para sua adesão no hospedeiro, além de ser capaz de induzir resposta inflamatória (GELLATLY; HANCOCK, 2013). O flagelo da *P. aeruginosa* é classificado em dois tipos antigênicos. O tipo “a” é altamente heterogêneo, sendo subdividido em 5 subtipos antigênicos. Já o tipo “b” se apresenta sorologicamente uniforme. Consequentemente, uma vacina para ser efetiva deve portar tanto o tipo antigênico “a” quanto o “b”, sendo assim bivalente (ROSOK et al., 1990; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Um estudo realizado com 483 voluntários com FC não colonizados com *P. aeruginosa*, mostrou a eficácia de uma vacina baseada em flagelo. Esses pacientes receberam 4 injeções de uma vacina flagelar bivalente (contendo os subtipos a₀a₁a₂ e o tipo b) ou placebo durante um período de 14 meses. Os indivíduos imunizados foram acompanhados durante 2 anos, por meio de cultura a partir de amostras obtidas da garganta e também por meio da presença de anticorpos anti-*Pseudomonas*. A vacinação não foi prejudicial, e houve o desenvolvimento de alto títulos de IgG anti-flagelo de longa duração. Os resultados finais foram baseados na observação de 381 pacientes, 189 vacinados e 192 imunizados com placebo. Registrou-se uma diminuição significativa na colonização com a bactéria nos pacientes vacinados (19,6%) comparado com o grupo que recebeu placebo (30,7%)

(DÖRING; MEISNER; STERN, 2007). Vacinas baseadas em flagelo têm se mostrado promissoras, mas ainda há a necessidade de se adicionar mais tipos antigênicos de flagelo, de modo a melhorar a eficácia e ampliar o espectro de proteção dos indivíduos vacinados a uma maior variedade de cepas (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

Os pili são estruturas na superfície da célula bacteriana, que assim como o flagelo, auxiliam na mobilidade e na adesão ao hospedeiro e, portanto, podem ser utilizados como possíveis alvos para vacinas (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Entretanto, alguns fatores atrapalham o desenvolvimento de uma vacina baseada nos pili. Inicialmente, os antígenos presentes nos pili são sorologicamente heterogêneos (CASTRIC; DEAL, 1994). Outro fator está relacionado com a região C-terminal da pilina, a proteína responsável pela composição do pilus. Essa região é o local de ligação ao receptor presente na célula hospedeira e apresenta epítomos conservados, de modo que sendo utilizada como antígeno, poderia gerar anticorpos que bloqueassem a fixação da bactéria ao hospedeiro e também poderia induzir anticorpos com reação cruzada. Porém, essa região de ligação ao receptor não está exposta na superfície, o que restringe a sua utilização em vacinas (AUDETTE; IRVIN; HAZES, 2004; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

O T3SS permite à *P. aeruginosa* injetar proteínas efetoras patogênicas diretamente no citosol da célula eucariótica, e para isso é necessária a proteína PcrV, a qual está presente na superfície da célula bacteriana e participa do transporte das proteínas efetoras da bactéria para a célula alvo (GELLATLY; HANCOCK, 2013; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Sawa et al. (1999) imunizaram camundongos com a proteína recombinante PcrV purificada e em seguida os infectaram com uma dose letal da cepa PA103, em um modelo de infecção pulmonar. Os anticorpos anti-PcrV induzidos após a imunização neutralizaram a proteína PcrV, bloqueando assim o transporte das proteínas do T3SS para os macrófagos alveolares e como consequência, observou-se maior sobrevivência dos animais imunizados com PcrV. Outro fator de virulência produzido pela *P. aeruginosa* é a exotoxina A. Chen et al. (1999) desenvolveram uma proteína recombinante por meio da deleção de 38 resíduos de aminoácidos da região carboxi-terminal da exotoxina A, a PE(Δ 576-613). Essa deleção ocorre no domínio da toxina que é responsável por inibir a síntese proteica na célula do hospedeiro, eliminando assim a citotoxicidade da exotoxina A. Verificou-se que a imunização dos animais com a PE(Δ 576-613) os protegeu do desafio com a exotoxina A, e isso foi possível devido à atividade de neutralização dos anticorpos anti-PE(Δ 576-613) induzidos pela imunização. Vacinas que tenham como alvo o T3SS e a exotoxina A se mostraram capazes de neutralizar a citotoxicidade e patogênese destes fatores de virulência, porém o seu uso é limitado pois são

menos efetivas em promover a eliminação da bactéria (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

As Opr da *P. aeruginosa* constituem porinas na superfície da célula bacteriana, sendo que OprF e OprI são antigenicamente conservadas entre as diferentes cepas (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Pesquisadores elaboraram uma vacina de DNA tendo como alvo a proteína OprF. Para isso, o gene que codifica essa proteína foi clonado em um plasmídeo, e este administrado aos camundongos por meio de biobalística. A imunização induziu anticorpos IgG anti-OprF, e em ensaios de opsonização, o soro dos animais imunizados com a vacina de DNA apresentou anticorpos com maior potencial de opsonização e conseqüentemente de fagocitose, quando comparado com o soro dos animais do grupo controle, os quais receberam apenas o plasmídeo sem o gene. Após a imunização e dois reforços, os animais foram infectados com a *P. aeruginosa* em um modelo de infecção pulmonar crônica. A análise dos pulmões mostrou redução nas lesões e também na quantidade de bactérias em contraste com o grupo controle (PRICE et al., 2001). Esse e outros resultados demonstram que as Opr são um dos antígenos mais promissores para o desenvolvimento de vacinas contra várias cepas de *P. aeruginosa* (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

Outra abordagem de vacinação é o uso de vacinas inativadas ou vivas atenuadas. Essas vacinas possuem diversos componentes antigênicos de modo que podem eliciar a resposta de diversos efetores da resposta imune do hospedeiro contra diferentes antígenos bacterianos (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Cripps et al. (2006) avaliaram a segurança e imunogenicidade de uma vacina contendo *P. aeruginosa* da cepa 385 sorotipo 2 inativada por formaldeído administrada pela via oral a indivíduos saudáveis. Após o estudo, em que duas doses foram administradas aos voluntários, concluiu-se que a formulação era segura, sem efeitos colaterais significativos associados às imunizações. Já na avaliação de imunogenicidade, verificou-se aumento na resposta de anticorpos IgA do soro dos voluntários vacinados, comparado com o soro pré-imune. Esses anticorpos foram reativos contra o extrato contendo células bacterianas de *P. aeruginosa*, e também contra o LPS. No ensaio de opsonização, verificou-se que o soro dos indivíduos vacinados foi capaz de induzir a opsonização das bactérias, seguida da fagocitose e morte intracelular por uma linhagem de macrófagos. A análise da saliva não mostrou aumento significativo na produção de anticorpos, e esse resultado pode estar relacionado com a dificuldade em se medir a resposta de anticorpos em secreções mucosas.

Um estudo empregando bactérias vivas atenuadas foi realizado para avaliar a produção de anticorpos após a imunização. A atenuação se deu por meio da deleção do gene *aroA* no

genoma do sorogrupo O2/O5 da cepa PAO1. Esse gene codifica uma enzima que participa da síntese de aminoácidos aromáticos. Assim, este mutante não é capaz de sintetizar aminoácidos aromáticos, não os obtém eficientemente do hospedeiro e conseqüentemente sobrevive por períodos curtos após a administração. Para se avaliar se o mutante era seguro, este foi aplicado intranasalmente em camundongos e mesmo após a administração de grandes concentrações da bactéria, a formulação com o mutante se mostrou segura. A imunogenicidade foi avaliada por meio da imunização de camundongos e coelhos. Os resultados mostraram que a imunização intranasal induziu altos títulos de anticorpos opsonizantes contra várias cepas do sorogrupo O2/O5, e no caso específico dos coelhos, a administração dos mutantes também eliciu a produção de anticorpos opsonizantes contra cepas de sorogrupos diferentes (PRIEBE et al., 2002). Apesar das diversas vantagens de se utilizar vacinas inativadas ou vivas atenuadas, elas podem apresentar toxicidade e alguma virulência residual, o que exige maior atenção no seu uso (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

2.7 Nanopartículas

Segundo a European Medicines Agency (EMA), nanotecnologia é o uso de estruturas de pequeno tamanho, menores que 1000 nm, as quais são projetadas para apresentar características específicas. Uma das áreas da nanotecnologia é a nanomedicina, que nada mais é do que o emprego da nanotecnologia na área médica. Visto que as NPs são um dos objetos de estudo da nanomedicina, pode-se defini-las como materiais particulados menores do que 1000 nm (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2017; HAFNER et al., 2014). Assim, é crescente o uso de NPs em diversas áreas da medicina moderna. Estes materiais podem ser utilizados para a obtenção de imagem de tecidos e células por meio da microscopia de fluorescência e ressonância magnética, para a prevenção de infecções, na entrega de fármacos e genes para o tratamento de diversas patologias, como cânceres, doenças degenerativas, oculares, respiratórias, infecciosas e alergias (FURNO et al., 2004; MURTHY, 2007; ROY, et al., 1999). NPs possuem características singulares que as diferenciam de outros materiais e que as tornam atraentes para o uso na área médica e farmacêutica, tais como o tamanho, mobilidade biológica, reatividade química e razão superfície/massa mais alta do que de outras partículas. Essa superfície além de ser ampla, também é funcional, o que permite a adsorção e carregamento de numerosas moléculas (DE JONG; BORM, 2008; MURTHY, 2007).

Nanocarreadores tais como lipossomos, micelas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, nanocristais e nanopartículas metálicas, são utilizados como sistemas de entrega de fármacos ou de outros compostos como peptídeos, proteínas recombinantes, vacinas e ácidos nucleicos (MARCATO; DURÁN, 2008). As NPs são sistemas coloidais formados por estruturas complexas, os quais têm o potencial de evitar a degradação enzimática do fármaco, aumentar sua absorção por possibilitar a difusão através do epitélio, alterar a distribuição do ativo nos tecidos, visando sítios específicos, o que pode aumentar a concentração do ativo no local onde o efeito terapêutico é desejado, reduzindo então a ação do fármaco em tecidos que não são alvos do tratamento, resultando na redução de efeitos colaterais (DE JONG; BORM, 2008; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; MARCATO; DURÁN, 2008; RAHIMNEJAD; JAHANSHAHI; NAJAFPOUR, 2006). Também podem melhorar a internalização dos ativos por células, prolongar a exposição ao princípio ativo por meio da liberação controlada e atenuar uma possível toxicidade do fármaco sem alteração dos efeitos terapêuticos (DE JONG; BORM, 2008; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; MARCATO; DURÁN, 2008).

O fármaco ou candidato vacinal pode ser dissolvido, ligado ou encapsulado à matriz da NP. O carregamento do fármaco neste sistema particulado pode ocorrer em dois momentos distintos: o ativo pode ser incorporado durante o preparo das NPs ou pode ser adsorvido nas NPs já formadas. Dependendo do método de produção, esses sistemas podem ser classificados como nanoesferas, onde o ativo é disperso de maneira uniforme na matriz, ou nanocápsulas, onde o fármaco fica envolto por uma membrana, confinado assim em uma cavidade (FIGURA 2) (SOPPIMATH et al., 2001).

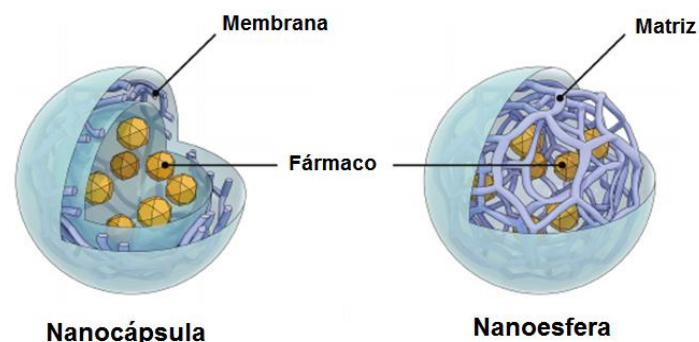


Figura 2- Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas.

Fonte: Adaptado de Suffredini, East e Levi (2014, p. 6).

A liberação do fármaco ou composto vacinal a partir das NPs pode ocorrer por meio da difusão através da matriz; erosão da matriz; difusão ao longo da matriz combinada com a erosão desta; difusão ao longo da membrana, no caso de nanocápsulas; e desorção do fármaco adsorvido à superfície do carreador (SOPPIMATH et al., 2001).

NPs são capazes de atravessar barreiras formadas por membranas (MARCATO; DURÁN, 2008), e assim possibilitam a entrega direcionada dos fármacos a diversos locais, como o sistema linfático, pulmões, fígado, baço, cérebro ou até mesmo podem permanecer por um longo período na circulação (HANS; LOWMAN, 2002). Diversos protocolos para o preparo desses sistemas particulados estão disponíveis, de acordo com o fármaco a ser utilizado e a via de entrega escolhida. É importante que os parâmetros do protocolo de preparo selecionado sejam moldados, de modo a criar NPs com as características desejadas (HANS; LOWMAN, 2002; MARCATO; DURÁN, 2008).

Diversos materiais podem ser utilizados para o preparo de NPs como veículos de entrega de vacinas, compreendendo polímeros, lipídeos e copolímeros. A taxa de degradação, a biocompatibilidade, lipofilicidade ou hidrofiliicidade e polaridade, são fatores determinantes na escolha do material a ser empregado (OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010).

O uso de NPs poliméricas, principalmente as biodegradáveis, demonstra um avanço em relação aos métodos clássicos de administração, principalmente no que diz respeito à eficiência e efetividade. As NPs poliméricas melhoram a estabilidade dos fármacos ou proteínas, possuem capacidade de liberação controlada e ainda permitem a entrega direcionada de altas concentrações do princípio ativo no local de interesse (MARCATO; DURÁN, 2008). Essas NPs podem ser preparadas a partir de polímeros naturais, tais como proteínas e polissacarídeos, ou sintéticos, como o poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e o copolímero poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (HANS; LOWMAN, 2002). É crescente o interesse no uso de polímeros naturais, devido aos efeitos tóxicos associados aos polímeros sintéticos, de modo que os polímeros de origem natural são considerados mais seguros (MARCATO; DURÁN, 2008). Os polímeros naturais incluem a quitosana, gelatina, alginato de sódio, colágeno, caseína e albumina, os quais vem sendo pesquisados para a entrega de nutrientes, fármacos, organismos probióticos e peptídeos bioativos (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011).

2.7.1 Nanopartículas e resposta imunológica

NPs são dispositivos capazes de interagir com células e outros componentes do sistema imunológico, de modo a estimular ou suprimir a resposta imune. NPs podem ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas, assim como podem gerar uma atividade anti-inflamatória (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

Várias vacinas em desenvolvimento atualmente utilizam componentes dos micro-organismos como imunógenos, ao contrário das vacinas convencionais, as quais são baseadas em micro-organismos inativados, vivos atenuados ou toxóides bacterianos. Entretanto, os antígenos oriundos dos patógenos apesar de serem mais seguros, podem não ser suficientemente imunogênicos (capazes de gerar uma resposta imune específica), ou seja, capazes de ativar linfócitos T e B (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Assim, são necessários adjuvantes imunológicos que sejam seguros, potentes e compatíveis, de modo a eliciar uma resposta imune ótima contra o antígeno vacinal (O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004; SINGH; O'HAGAN, 1999).

Adjuvantes são substâncias que quando administradas juntamente com o antígeno, aceleram, prolongam e melhoram a resposta imune direcionada a esse antígeno vacinal, produzindo maior imunidade do que o antígeno sozinho (RAMON, 1924 apud SINGH; O'HAGAN, 1999; VOGEL, 1995). Essas substâncias são capazes de tornar a resposta imune contra o antígeno vacinal mais eficiente, mas não são por si só imunogênicas (OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010). Tanto os tradicionais quanto os novos adjuvantes, podem ser divididos em duas categorias: aqueles que atuam como imunoestimulantes e aqueles que atuam como sistemas de entrega de antígenos. Os adjuvantes que atuam como imunoestimulantes ativam as APCs por meio da interação com receptores e/ou por meio de outras vias, estimulando então a resposta imune inata, fornecendo o contexto inflamatório requerido para uma ativação ótima da resposta imune antígeno específica. Entre estes receptores estão os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como os TLRs. Já os sistemas de entrega, direcionam os antígenos para as APCs, aumentando a quantidade de antígenos que chegam até essas células (O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004; O'HAGAN; VALIANTE, 2003). Apesar dessa separação conceitual dos adjuvantes em categorias, eles podem combinar as propriedades de imunoestimulação e sistema de entrega (ROITT; DELVES, 2004).

NPs poliméricas biodegradáveis associadas a antígenos vacinais, tais como proteínas, DNA e peptídeos, vem sendo utilizadas como sistemas de entrega de vacinas e possuem potencial imunoestimulante, funcionando então como adjuvantes. É importante ressaltar que o

desenvolvimento de vacinas efetivas depende em grande parte da entrega do antígeno para as DCs, visto que essas células são APCs essenciais para iniciar as respostas imunológicas adquiridas, principalmente a resposta imune mediada por células (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Assim, o potencial adjuvante das NPs poliméricas biodegradáveis se deve a inúmeros fatores, e depende em grande parte da sua captura pelas APCs, como as DCs. As NPs direcionam a entrega do antígeno vacinal para APCs, favorecem a sua captura, se comparado com o antígeno solúvel, e além disso, otimizam a ativação imunológica, já que mantém o antígeno intacto por mais tempo e assim aumentam a oportunidade para a sua captura e processamento pelas DCs (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Também podem funcionar como depósitos de antígeno, liberando-o de maneira controlada, tanto intra quanto extracelularmente, aumentando assim sua disponibilidade para o sistema imune (RICE-FICHT et al., 2010). Ademais, esses dispositivos são capazes de atuar nas DCs, levando a sua ativação, maturação e ainda controlam a liberação e distribuição intracelular dos antígenos (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012) (FIGURA 3). Todos esses aspectos permitem a potencialização da resposta imune humoral e celular aos antígenos vacinais.

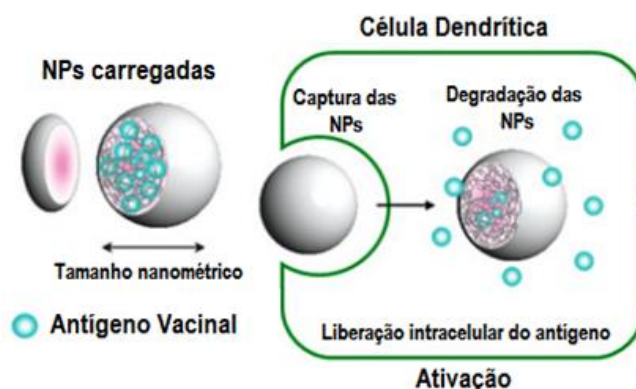


Figura 3- Internalização das nanopartículas (NPs) pela célula dendrítica (DC).

Fonte: Adaptado de Akagi, Baba e Akashi (2012, p. 46).

Diversos fatores podem influenciar na resposta imunológica induzida pela administração de antígenos associados a NPs, tais como o tamanho da partícula, sua morfologia, composição, potencial Zeta (carga superficial), estrutura química e hidrofobicidade superficial (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012; ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

A resposta imune gerada pelos modelos vacinais baseados em NPs pode ser influenciada e modulada pelo tamanho dessas partículas. Gutierrez et al. (2002) avaliaram a resposta imune de camundongos BALB/c imunizados com NPs de PLGA carregadas com

BSA, as quais apresentavam tamanhos de 200, 500 e 1000 nm. Eles observaram que as NPs de 200 e 500 nm eliciaram menores níveis de IgG anti-BSA do que comparado com as partículas de 1000 nm. Do mesmo modo, em um outro estudo empregando NPs de PLA carregadas com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), com uma faixa de tamanho variando entre 200 e 600 nm, e micropartículas também de PLA carregadas com HBsAg, com tamanhos que variaram de 2 a 8 μm , observou-se que os animais imunizados com as NPs apresentaram menores níveis de anticorpos IgG anti-HBsAg quando comparado com os animais imunizados com as micropartículas (KANCHAN; PANDA, 2007). Outros estudos, porém, mostram que partículas menores possuem maior potencial adjuvante do que partículas maiores (OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010). Jung et al. (2001) sintetizaram NPs associadas ao toxóide tetânico (TT) e utilizaram essas partículas para imunizar camundongos BALB/c pela via oral, nasal e intraperitoneal. Eles observaram que os níveis de IgA e IgG após as imunizações via oral e nasal, se mostraram mais elevados nos animais imunizados com as NPs de 100 e 500 nm do que nos animais imunizados com as micropartículas com tamanho superior a 1000 nm.

Além de influenciar a intensidade da resposta imune, como mostrado anteriormente, o tamanho das partículas pode modular o perfil da resposta gerada, afetando assim tanto quantitativamente quanto qualitativamente a resposta imunológica ao antígeno vacinal. Em diversos estudos, os autores observaram uma tendência das partículas menores em induzir uma resposta celular, e das partículas maiores em induzir uma resposta humoral (KANCHAN; PANDA, 2007; OYEWUMI; KUMAR; CUI, 2010). Chong e et al. (2005), sintetizaram NPs de PLGA associadas ao HBsAg com monofosfolípídeo A, de aproximadamente 300 nm. Eles constataram que os animais imunizados com essa formulação foram capazes de apresentar uma resposta imune celular, mais especificamente com presença de células Th1. Em um outro estudo, onde foram preparadas NPs de PLGA carregadas com BSA, as NPs com tamanhos de 200 e 500 nm induziram menor resposta humoral, do que comparado com as partículas de 1000 nm (GUTIERRO et al., 2002).

O tamanho dessas partículas também pode influenciar o perfil de resposta das células T CD4. Kanchan e Panda (2007) formularam NPs e micropartículas de PLA carregadas com HBsAg. As NPs com tamanhos de 200 a 600 nm foram capturadas por macrófagos e induziram altos níveis de IFN- γ , e uma razão IgG1/IgG2a reduzida. Tanto a presença de IFN- γ quanto de IgG2a indicam um perfil de resposta de células T CD4 do tipo Th1. Já as micropartículas com tamanho variando de 2 a 8 μm , não foram internalizadas pelos macrófagos, se encontrando aderidas a sua superfície. Essas partículas induziram a secreção

de IL-4 e IgG1, indicando um perfil de resposta do tipo Th2. Assim, é provável que o sistema imune diferencie o tamanho das partículas carreadoras de antígenos e induza respostas imunológicas distintas (ELSABAHY; WOOLEY, 2013).

Além de atuar na intensidade e tipo de resposta imunológica, o tamanho das partículas também influencia na sua captura pelas DCs (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Foged et al. (2005) testaram a captura de partículas de poliestireno de diferentes tamanhos, variando de 0.04 a 15 μm , por DCs imaturas diferenciadas a partir de células mononucleares isoladas de sangue humano. As análises de captura mostraram que as NPs de 500 nm ou de tamanhos inferiores, foram as que apresentaram a internalização mais rápida e eficiente pelas DCs.

Assim como o tamanho, a carga da partícula e sua morfologia são importantes para a sua captura. Na maioria das vezes, partículas catiônicas ou aniônicas são melhor internalizadas pelas células do que aquelas sem carga (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007). Assume-se que quanto maior o potencial Zeta das NPs, maior sua captura, devido à presença de proteoglicanos negativamente carregados na superfície celular (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Com relação à forma das NPs, há estudos que mostram que partículas esféricas são mais facilmente fagocitadas do que aquelas com formato semelhante a vermes (CHAMPION; MITRAGOTRI, 2009).

NPs também podem levar à ativação do sistema complemento. As proteínas do complemento podem se ligar a receptores presentes em células da linhagem mieloide e linfoide, de modo a regular a resposta de linfócitos e outras células imunes. Dessa forma, o sistema complemento pode melhorar a resposta das células B ao antígeno, assim como pode promover a ativação de DCs e células T (CARROLL, 2004; REDDY et al., 2007; DOBROVOLSKAIA et al., 2008). Reddy et al. (2007) sintetizaram NPs capazes ativar o complemento, e exploraram este sistema como um sinal de alarme da imunidade inata, em uma estratégia adjuvante alternativa. Eles introduziram as NPs pela via intradérmica de ratos e observaram que a ativação do complemento foi capaz de estimular as DCs.

Quando as NPs são administradas pela via intravenosa, entram em contato com vários componentes do sistema imune. Após a introdução por essa via, as NPs são expostas quase que imediatamente a células sanguíneas e a proteínas (ELSABAHY; WOOLEY, 2013). Em resposta às NPs, assim como em resposta a qualquer material estranho que entra no organismo, o corpo monta uma resposta biológica. Assim, pode ocorrer a adsorção de proteínas ao redor da superfície das partículas, levando então à formação de uma coroa proteica. Propriedades das NPs, como carga superficial, hidrofobicidade, tamanho, formato e composição, podem influenciar em sua associação a proteínas (AGGARWAL et al., 2009). A

opsonização das NPs pelas proteínas, sua interação com as células do sangue e a composição da coroa proteica, definem a biodistribuição e eficácia terapêutica desses nanocarreadores. Os elementos mais comumente encontrados na coroa proteica são imunoglobulinas, albumina, proteínas do sistema complemento, fibrinogênio e apolipoproteína (ELSABAHY; WOOLEY, 2013). Apesar de algumas proteínas serem específicas para determinadas NPs, sugere-se que pelo fato desses elementos proteicos serem abundantes no sangue, sejam encontrados ligados à superfície das NPs. O que não está bem estabelecido ainda é a afinidade dessas proteínas pelas NPs (CEDERVALL et al., 2007 apud AGGARWAL et al., 2009; AGGARWAL et al., 2009).

É importante destacar que a adsorção de elementos proteicos nas NPs é um dos maiores obstáculos *in vivo* para sua estabilidade e entrega no sítio de interesse. A ligação de proteínas, tais como imunoglobulinas e componentes do complemento, é capaz de induzir a fagocitose das NPs por células fagocitárias mononucleares, removendo-as assim da circulação. A captura das NPs revestidas por proteínas pelos fagócitos, é também um dos obstáculos que as impede de chegar no tecido alvo do tratamento (AGGARWAL et al., 2009; ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Com relação à estabilidade, a opsonização das NPs pode desestabilizá-las e levar à liberação precoce do ativo carregado (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

Apesar de a opsonização e fagocitose das NPs serem obstáculos para a entrega de fármacos em tecidos alvos do tratamento, em alguns casos esses processos podem ser benéficos, como por exemplo no desenvolvimento de vacinas. A opsonização das NPs por imunoglobulinas, por exemplo, pode facilitar a fagocitose dessas partículas por parte das APCs. Essa maior fagocitose beneficia a ativação das células da imunidade adquirida pelas APCs, o que melhoraria a eficácia vacinal (PANTIC, 2011). Porém deve-se atentar também que a opsonização das NPs por imunoglobulinas pode levar à formação de imunocomplexos. Sabe-se que a deposição de imunocomplexos, principalmente nos vasos e no tecido renal, induz uma resposta inflamatória que é dependente do complemento, a qual pode ser lesiva (FLIGIEL et al., 1984; WARD; FATTAHI; BOSMANN, 2016).

Além de atuarem como adjuvantes vacinais melhorando a resposta imune antígeno específica, as NPs podem ser imunogênicas, ou seja, capazes de induzir uma resposta imune específica que as tenha como alvo. A imunogenicidade das NPs é resultado de suas características físico-químicas, como carga, tamanho e hidrofobicidade. O fármaco que está sendo carregado, o modelo animal utilizado e via de administração também interferem na sua imunogenicidade (ELSABAHY; WOOLEY, 2013).

Macromoléculas e NPs podem ser internalizadas pelas células de mamíferos por meio da endocitose (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007). A endocitose das NPs depende da sua composição, carga, tamanho, forma e também depende do tipo e densidade das células presentes (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Existem vários tipos de endocitose, sendo que em todos eles ocorre a formação de vesículas intracelulares oriundas da membrana plasmática. A endocitose pode ser dividida em duas categorias: fagocitose, que é a captura de partículas grandes, geralmente com mais de 0,5 μm , e pinocitose, que é a internalização de fluidos e solutos. Como a pinocitose permite a internalização de fluidos que circundam a célula, as substâncias presentes nesses fluidos também serão capturadas (CONNER; SCHMID, 2003; IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011).

Diversas vias de administração podem ser consideradas para a imunização com NPs. Esses sistemas podem ser administrados pela via intravenosa, subcutânea, intramuscular, intraocular, nasal, oral, intraperitoneal, vaginal e retal (ELSABAHY; WOOLEY, 2012; ELSABAHY; WOOLEY, 2013; KONG et al., 2011). O destino das NPs após a administração subcutânea varia dependendo de seu tamanho. NPs menores do que 100 nm são drenadas diretamente para os capilares linfáticos por meio dos espaços presentes nas células endoteliais. Já as que possuem tamanho acima de 100 nm, são fagocitadas pelas DCs, as quais migram então para os capilares linfáticos (PITAKSUTTEEPONG, 2005).

2.7.2 Nanopartículas de albumina sérica

A albumina sérica é a proteína com maior abundância no plasma sanguíneo dos seres vertebrados, podendo ser encontrada em uma concentração de até 50 mg/mL no plasma humano (MERLOT; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2014). Essa proteína é biodegradável, de modo que não se acumula de forma definitiva nos tecidos, biocompatível e metabolizada *in vivo* em produtos finais não tóxicos. Além disso, a albumina é fácil de purificar, estável e hidrofílica (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; RAHIMNEJAD; JAHANSHAH; NAJAFPOUR, 2006). A albumina é estável no pH entre 4 e 9, e pode ser aquecida por mais de 10 horas em uma temperatura de 60 °C sem efeitos danosos (ZHAO et al., 2010). Assim, a albumina é um candidato promissor para o preparo de NPs poliméricas biodegradáveis. NPs a base de albumina podem ser preparadas facilmente, sendo que as três principais técnicas de preparo são a coacervação (dessolvatação), emulsificação ou geleificação térmica (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

No processo de coacervação ou dessolvatação, a albumina dissolvida em água ultrapura (pH entre 7 e 9) é transformada em NP pela adição gota a gota de um agente de dessolvatação (etanol ou acetona) sob agitação constante até a obtenção de uma solução opalescente (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; LANGER et al., 2003; NIKNEJAD; MAHMOUDZADEH, 2015). A adição do agente de dessolvatação faz com que ocorra uma redução na solubilidade da albumina com relação à água. As partículas de albumina formadas ainda não se encontrando completamente estabilizadas na solução aquosa, podem redissolver (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). Para a estabilização das partículas formadas, é adicionado no coacervado, ainda sob agitação, um agente de reticulação, como o glutaraldeído (MERODIO et al., 2001; NIKNEJAD; MAHMOUDZADEH, 2015). O glutaraldeído reage apenas com os grupos amino na superfície da partícula, e essa reticulação tem como resultado a ligação de dois grupos amino pelo aldeído (WEBER et al., 2000). Essa etapa de reticulação influencia na biodegradabilidade e na liberação do ativo (LEE; SOKOLOSKI; ROYER, 1981 apud WEBER et al., 2000). Após o período de incubação da solução de albumina com o glutaraldeído, as nanopartículas podem ser centrifugadas para sua purificação, de modo a retirar a albumina livre e o excesso de glutaraldeído. O precipitado formado após o processo de centrifugação pode ser então ressuspensionado em solução de tampão fosfato salina (PBS), para a recuperação das NPs formada (MERODIO et al., 2001). Este método de produção de NPs a base de albumina apresenta como vantagens a não necessidade de aparelhagem complexa e dispendiosa, e o uso de reagentes relativamente simples e de fácil aquisição. A desvantagem está relacionada com a reprodutibilidade deste método, visto que em algumas etapas é uma técnica estritamente manual e assim podem haver variações nas NPs obtidas dependendo do experimentador. A Figura 4 mostra o processo de preparo de nanoesferas de albumina pelo método de coacervação.

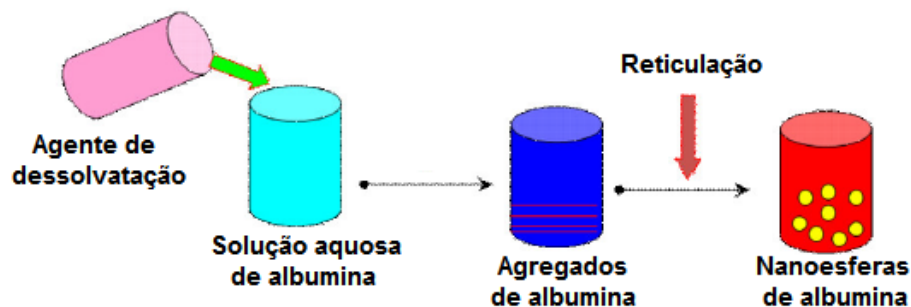


Figura 4- Preparo de nanoesferas de albumina pela técnica de coacervação.
Fonte: Adaptado de Rahimnejad; Mokhtarian e Ghasemi (2009, p. 4740).

A emulsificação é realizada misturando-se uma fase orgânica, como um óleo, à fase aquosa, como a solução de albumina. Assim, ocorre a dissolução de substâncias lipofílicas em um solvente orgânico, o qual é emulsionado em uma solução aquosa. Este processo leva então à formação de partículas, as quais podem ser estabilizadas por meio do tratamento térmico ou químico (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; SUNDAR; KUNDU; KUNDU, 2010). Este método apresenta certas desvantagens como a necessidade de se adicionar solventes orgânicos para a remoção tanto dos surfactantes utilizados para a estabilização das emulsões quanto para a remoção dos resíduos de óleo adicionados no processo (LANGER et al., 2003).

A técnica de geleificação térmica é baseada em uma sequência de processos, os quais envolvem o desdobramento proteico como resultado do aquecimento, seguido por interações proteína-proteína, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e reações de troca sulfidril-dissulfeto (QI et al., 2010).

Em virtude da presença de diversos sítios de ligação na molécula de albumina, uma grande quantidade de fármaco pode ser associada à sua matriz (MÜLLER; LEUENBERGER; KISSEL, 1996). De acordo com Elzoghby, Samy e Elgindy (2012) e Irache et al. (2005), devido a sua estrutura primária definida e à presença de aminoácidos carregados, como a lisina, as NPs produzidas com albumina permitem a adsorção eletrostática de moléculas carregadas positivamente, como o ganciclovir, um fármaco antiviral e também permitem a adsorção eletrostática de moléculas carregadas negativamente, como oligonucleotídeos (GASELOWITZ; NECKERS, 1995; MERODIO et al., 2001). Além disso, as NPs de albumina também podem se associar aos fármacos por meio de ligação covalente (MERODIO et al., 2001).

A proteína albumina pode ser obtida comercialmente a partir de fontes diversas, como exemplo a BSA, albumina sérica humana (HSA), leite, grãos e clara de ovo (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). A BSA é amplamente empregada em pesquisas que utilizam modelos proteicos, visto sua importância médica, baixo custo, propriedades atípicas de ligação a compostos, facilidade de purificação, estabilidade, além de ser homóloga à HSA. Essa proteína possui um peso molecular de 69323 Da, 607 aminoácidos e um ponto isoelétrico de 4.7 na água a 25 °C (HU et al., 2006; TANTRA; TOMPKINS; QUINCEY, 2010).

A albumina pode ser utilizada como veículo para agentes terapêuticos, melhorando o perfil farmacocinético do fármaco, de modo que um grande número de terapias baseadas em albumina está atualmente na fase clínica de testes (WEISSIG; PETTINGER; MURDOCK, 2014). Um dos melhores exemplos do emprego da albumina em terapias é o Abraxane[®],

desenvolvido pela American Bioscience. O Abraxane[®] compreende NPs com tamanho de 130 nm, preparadas a partir de HSA conjugadas com o fármaco paclitaxel, utilizado para o tratamento de câncer de mama. Essas NPs alteram a farmacocinética do paclitaxel, levando ao seu acúmulo no sítio tumoral (ELSADEK; KRATZ, 2012; WEISSIG; PETTINGER; MURDOCK, 2014). O Abraxane[®] foi aprovado inicialmente em 2005 pela U.S. Food and Drug Administration (USFDA) para o tratamento de câncer de mama metastático, e em seguida aprovado em mais de 40 países em todo o mundo (ELSADEK; KRATZ, 2012). Além do Abraxane[®], NPs de albumina têm sido utilizadas para encapsular outros fármacos anti-câncer, como o docetaxel, o inibidor da proteína de choque térmico Hsp90, o taxano CY196, entre outros (KOUCHAKZADEH; SAFAVI; SHOJAOSADATI, 2015).

Os trabalhos que utilizam NPs de albumina para o preparo de vacinas foram produzidos pelo nosso grupo de pesquisa. Silva et al. (2012) avaliaram a produção de anticorpos IgG anti-DENV em camundongos imunizados com NPs de BSA adsorvidas com os 4 sorotipos do DENV inativado. Observou-se alta produção de anticorpos IgG anti-DENV nos camundongos imunizados com as NPs contendo os vírus inativados. Entretanto, os anticorpos produzidos pelos animais imunizados com as NPs contendo os vírus inativados não apresentaram atividade neutralizante. Em um outro estudo, Rodrigues et al. (2013) verificaram a capacidade de NPs de BSA contendo proteínas totais da *P. aeruginosa* ATCC 27853 aprisionadas, em proteger camundongos infectados pela via nasal com esse patógeno. O grupo de animais imunizados com a formulação contendo NPs associadas aos antígenos bacterianos, apresentaram alta produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*. Os camundongos imunizados com as NPs associadas aos antígenos bacterianos também mostraram menor inflamação pulmonar. Esses resultados indicam que a formulação de NPs associadas a antígenos da bactéria *P. aeruginosa* é capaz de induzir uma resposta funcional em um modelo animal de infecção com esse patógeno, de modo que é uma plataforma promissora para o desenvolvimento de vacinas anti-*P. aeruginosa*.

A bactéria *P. aeruginosa* é, portanto, um importante patógeno oportunista associado principalmente a pacientes imunossuprimidos e com FC. Uma vez estabelecida a infecção, o tratamento é dificultado, dada sua resistência intrínseca e adquirida a uma ampla variedade de antimicrobianos. Devido a isso, diversas vacinas foram e estão sendo avaliadas com o intuito de tornar os indivíduos resistentes a infecção. Apesar do intenso esforço em se desenvolver métodos imunoprolifáticos que previnam a infecção causada pela *P. aeruginosa*, ainda não está disponível no mercado nenhuma vacina contra esse patógeno. NPs têm mostrado potencial como sistemas de entrega de antígenos vacinais com atividade adjuvante, de modo

que estão sendo cada vez mais exploradas como modelos vacinais. Dessa forma, esta pesquisa pretende avaliar a eficácia de NPs de BSA associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853, em induzir proteção contra o desafio em modelo murino utilizando a cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14.

3 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados o objetivo geral e objetivos específicos deste trabalho.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial das nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em induzir proteção contra a infecção nasal utilizando a cepa virulenta de *P. aeruginosa* em modelo murino.

3.2 Objetivos Específicos

- a) obter nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853;
- b) caracterizar fisicamente, quanto à morfologia, carga e tamanho, as nanopartículas de albumina sérica bovina produzidas;
- c) avaliar a taxa de captura das nanopartículas produzidas pelas células RAW 264.7 e BHK-21;
- d) avaliar a citotoxicidade das nanopartículas produzidas sobre células RAW 264.7 e BHK-21;
- e) avaliar a produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA nos camundongos imunizados com as nanopartículas produzidas;
- f) quantificar a carga bacteriana, a taxa de sobrevivência, a produção de citocinas e os aspectos histopatológicos nos pulmões dos animais imunizados e infectados com a *P. aeruginosa* PA14.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico serão descritas as metodologias empregadas neste trabalho.

4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

A bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi doada pela professora doutora Luciene Andrade da Rocha Minarini do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Alfenas. Já a bactéria *P. aeruginosa* PA14 foi cedida pela professora doutora Regina Baldini do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Ambas as cepas foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Para o cultivo da *P. aeruginosa* ATCC 27853, 500 µL de *P. aeruginosa* ATCC 27853 congelada em 20% de glicerol foram inoculados em 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubados em estufa por 24 horas a 37 °C. Os 5 mL da cultura foram posteriormente inoculados em 50 mL de caldo LB e incubados em estufa por 48 horas a 37 °C. Já para o cultivo da *P. aeruginosa* PA14, 1 mL de *P. aeruginosa* PA14 congelada em 20% de glicerol foram inoculados em 5 mL de caldo LB e incubados em agitador horizontal a 180 rpm a 37 °C por 48 horas.

4.2 Extração das proteínas totais

Para a extração das proteínas da *P. aeruginosa* ATCC 27853 e PA14, os 50 mL da cultura foram centrifugados a 2944 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento congelado a -20 °C. O sedimento foi então lisado à temperatura ambiente sob agitação durante 60 minutos utilizando 5 mL de tampão de lise (Guanidina 6 M pH 8,0) com 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). O lisado foi centrifugado a 9800 g durante 30 minutos e o sobrenadante coletado para a realização da diálise. A diálise foi realizada utilizando membranas de diálise com poros de 12 kDa (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS sob agitação a 4 °C por 16 horas. O dialisado foi armazenado a -20 °C para posterior determinação da concentração proteica por meio do ensaio do ácido bicinonínico (BCA) (Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, as proteínas totais de *P. aeruginosa* foram separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) utilizando o aparato Bio-Rad Mini Protean (Bio-Rad, EUA) e coradas por meio de Coomassie Blue.

4.3 Preparo e caracterização das nanopartículas

Para a produção de NPs associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa), 500 µg de antígenos proteicos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram incubados com 3 mL de solução aquosa de BSA (2% m/v; pH=7,2) (Sigma-Aldrich, EUA) durante 30 minutos sob agitação constante à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a etapa de coacervação, adicionando-se etanol gota a gota (etanol:água relação 1,5:1) em agitação constante. Após a etapa de coacervação, afim de se estabilizar as partículas formadas, foi feita a reticulação ou ligação cruzada, adicionando-se 50 µL de glutaraldeído a 25%. A solução ficou sob agitação constante durante 2 horas à temperatura ambiente. Para a purificação, centrifugou-se a solução a 6800 g durante 15 minutos, para eliminar o BSA livre e o excesso de glutaraldeído. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos ressuspendidos em PBS estéril, em uma concentração final de 20 mg/mL. Também foram produzidas NPs vazias, ou seja, contendo apenas BSA (NPV) (SILVA et al., 2012).

As NPs foram caracterizadas quanto à morfologia por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM), utilizando o microscópio de força atômica Veeco Multimode (Veeco, EUA). O tamanho das partículas e índice de polidispersão, foram determinados por meio da técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), enquanto que o potencial Zeta, foi determinado por meio da técnica de Laser Doppler. Todas essas caracterizações foram realizadas utilizando-se o equipamento Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano SZ, Reino Unido), as quais foram executadas na Universidade Federal do Piauí, Campus Parnaíba.

4.4 Preparo de nanopartículas fluorescentes

Para a produção de NPs fluorescentes, realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém antes de proceder ao processo de coacervação, foi adicionado à solução de BSA e antígeno, 50 µL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, EUA) a 1 mg/mL diluído em etanol.

4.5 Avaliação da taxa de captura em células RAW 264.7 e BHK-21

As células RAW 264.7 são uma linhagem celular macrofágica oriunda do sangue de camundongos, enquanto as células BHK-21 são fibroblastos oriundos do rim de hamsters bebê. As células RAW 264.7 e BHK-21 foram cultivadas em meio essencial mínimo

modificado por Dulbecco (DMEM) (Vitrocell embriolife, Brasil) contendo 10% e 5% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell embriolife, Brasil), respectivamente, e antibióticos Penicilina/Estreptomicina (P/E) (Vitrocell embriolife, Brasil) e antifúngico Anfotericina B (AnfB, Vitrocell embriolife, Brasil). As células foram cultivadas em uma concentração de 1×10^5 células por poço em placas de 6 poços (Kasvi, Brasil), sobre lamínulas de 24x24 mm previamente esterilizadas. Após 48 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foi adicionado a cada poço 1 mL de uma solução de NPs fluorescentes a 2 mg/mL. Como controle de células, utilizou-se células não tratadas. Após 4 e 24 horas, o meio de cultura foi removido, as lamínulas lavadas 2 vezes com 2 mL de PBS e em seguida fixadas com 2 mL de PBS contendo 10% de formaldeído por 15 minutos. Os núcleos foram corados com o corante bisbenzimidida H33258 (Sigma-Aldrich, EUA). Para isso, o fixador foi retirado dos poços e adicionado 1 mL de bisbenzimidida H33258 a 1 µg/mL diluído em PBS sobre as lamínulas por 10 minutos. Após esse intervalo, a solução de bisbenzimidida H33258 foi removida e as lamínulas lavadas com PBS. Em seguida, posicionou-se as lamínulas em lâminas de microscopia para a visualização das células no microscópio de fluorescência Leica DM750 (Leica Microsystems, Alemanha) e a porcentagem de células positivas, as quais internalizaram as NPs, foi determinada em relação ao número total de células em pelo menos 10 campos diferentes.

4.6 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das NPPa, NPV e das proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa), foi realizada utilizando-se o método de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA). Células RAW 264.7 e BHK-21, cultivadas em meio DMEM (Vitrocell embriolife, Brasil) contendo 10% e 5% de SFB (Vitrocell embriolife, Brasil), respectivamente, e antibióticos P/E (Vitrocell embriolife, Brasil) e antifúngico AnfB (Vitrocell embriolife, Brasil), foram cultivadas em uma concentração de 1×10^4 células por poço, cada um contendo 100 µL de células, em placas de 96 poços (TPP, Suíça). Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, as células foram tratadas com PPa, NPPa e NPV, diluídos de maneira seriada. As concentrações das NPs variaram de 2000 a 156 µg/mL, enquanto que as concentrações das PPa variaram de 198 a 1,5 µg/mL. As células foram incubadas a 37 °C a 5% de CO₂ por 48 horas. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada um dos poços, e as células incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 4 horas. Em seguida, o meio foi removido e adicionados 100 µL de

dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. Agitou-se suavemente a placa por 15 minutos e a absorbância foi medida no leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt (Biochrom, Reino Unido) a 570 nm.

Além de se analisar a citotoxicidade das PPa sobre as células RAW 264.7 e BHK-21 durante o período de 48 horas, avaliou-se também a citotoxicidade das PPa e das proteínas totais de *P. aeruginosa* PA14 sobre as células RAW 264.7 durante um período de 24 horas. O mesmo procedimento descrito anteriormente foi utilizado para a avaliação da citotoxicidade das proteínas de ambas as cepas sobre as células RAW 264.7 por 24 horas. As concentrações das proteínas variaram de 198 a 0,0967 µg/mL.

4.7 Protocolo de imunização

Camundongos *Swiss* fêmeas de seis a oito semanas de idade foram mantidos com acesso livre à água e ração. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética Animal da Instituição e aprovado (645/2015). Os animais foram imunizados pela via subcutânea nos dias 0, 7 e 14 com 100 µL de NPV ou NPPa na concentração final de 20 mg/mL. Outros animais foram tratados com 100 µL de PBS ou com 100 µL de PBS contendo 5 µg de PPa, como controles negativos e positivos, respectivamente. Os camundongos foram anestesiados com 100 µL de uma solução de PBS contendo 1,53 mg/mL de Xilazina (Anasedan, Ceva, Brasil) e 30,67 mg/mL de Quetamina Agener (Agener União, Brasil), pela via intraperitoneal, e o sangue coletado pela veia submandibular 7 dias após a última imunização para a avaliação da produção de anticorpos específicos para os antígenos totais de *P. aeruginosa* e para BSA.

4.8 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para detecção e titulação de anticorpos IgG total anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA

Após a coleta do sangue dos camundongos, este foi mantido a 4 °C por 1 hora, e em seguida centrifugado a 600 g durante 10 minutos. O soro foi recolhido e congelado a -20 °C até o momento de realização do ELISA para a quantificação de anticorpos IgG total anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA. Para a realização do ELISA, utilizaram-se placas de microtitulação de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBioscience, EUA). Os poços foram revestidos com os antígenos totais de *P. aeruginosa* (20 µg/mL) ou com BSA (20µg/mL), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M pH 9,6). Foram adicionados 100 µL da solução por poço, e a placa incubada por 16 horas a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com solução

de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), 300 µL por poço, e depois bloqueada com 200 µL de PBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado (Molico® Nestlé, Brasil) durante 2 horas a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada seis vezes com PBS-T, 300 µL por poço, e posteriormente foram adicionados 96 µL de PBS-T e 4 µL dos soros dos animais, em uma concentração final de 1:25. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Nos poços de branco, foram adicionados 100 µL do PBS-T. Após esse período, lavou-se a placa novamente quatro vezes com PBS-T, 300 µL por poço, e foram acrescentados 100 µL de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:2000 em PBS-T, por poço. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida, a placa foi lavada quatro vezes com PBS-T, 300 µL por poço, e depois foram adicionados 100 µL por poço de uma solução de Dicloridrato de O-Fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato (0,1 M de ácido cítrico, 0,1 M de fosfato de sódio, pH 4,5) com 0,08% de H₂O₂. Após a adição da solução, a placa foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz, e após este tempo, as densidades ópticas foram lidas a 450 nm em um leitor de microplacas Anthos Zenyth 200rt (Biochrom, Reino Unido).

Também foi realizada a titulação dos anticorpos presentes nas amostras, e para isso, diluiu-se os soros dos animais de cada grupo de maneira seriada, com concentrações variando de 1:25 a 1:3200. O valor de corte foi definido como a média das leituras de absorbância do controle negativo (animais tratados com PBS) mais duas vezes o desvio padrão. O título registrado foi a maior diluição de cada amostra de soro que apresentou reatividade acima do valor de corte (RODRIGUES et al., 2013).

4.9 Desafio dos animais imunizados

Duas semanas após a última imunização, os animais foram anestesiados com 100 µL de uma solução de PBS contendo 1,53 mg/mL de Xilazina (Anasedan, Ceva, Brasil) e 30,67 mg/mL de Quetamina Agener (Agener União, Brasil) pela via intraperitoneal. Em seguida, eles foram desafiados com 10 µL da bactéria em meio LB em cada narina (8×10^7 UFC/animal) de uma cultura de *P. aeruginosa* PA14 crescida por 48 horas (4×10^9 UFC/mL; Densidade óptica a 600nm = 1,253) (TANG; KAYS; PRINCE, 1995; ALLEWELT et al., 2000; GRASSMÉ et al., 2000; CUI et al., 2015; LI et al., 2016). A mortalidade foi avaliada em um prazo máximo de 48 horas após a infecção. Os animais que permaneceram vivos após 48 horas foram eutanasiados através da administração excessiva de anestésico. Os pulmões foram coletados para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por

miligrama de tecido, para análise da produção de citocinas e para a avaliação histopatológica. Animais não imunizados e não infectados (NI) foram utilizados e serviram como controle da infecção.

4.10 Determinação do número de unidades formadoras de colônia no pulmão dos animais infectados

Os pulmões direitos foram coletados, pesados e homogeneizados em 1 mL de PBS contendo PMSF 0,5 mM. Após a homogeneização, foram realizadas diluições seriadas das suspensões (10^{-1} a 10^{-6}) e 50 μ L de cada diluição foram plaqueados em placas de 6 poços contendo ágar LB. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C e após este período, realizou-se a contagem de UFC.

4.11 Quantificação de citocinas no pulmão dos animais infectados

As suspensões dos pulmões direitos não diluídas foram centrifugadas a 2655 g durante 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -80 °C para posterior dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 por citometria de fluxo utilizando o kit BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, EUA), e o equipamento BD FACSVerser (BD Biosciences, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Essa análise foi realizada no Instituto René Rachou/Fiocruz Minas Gerais, em Belo Horizonte. A ferramenta *Heatmapper* foi utilizada para representar os níveis de expressão das sete citocinas nos diferentes grupos na forma de um mapa de aquecimento (*Heatmap*).

4.12 Histopatologia

Os pulmões esquerdos dos camundongos foram coletados e fixados à temperatura ambiente, utilizando formaldeído 10% diluído em PBS. Posteriormente, foram desidratados em etanol e incluídos em parafina. Secções de 5 μ m foram obtidas em micrótomo rotativo e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram examinados sob microscópio óptico AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemanha) e as imagens foram capturadas utilizando-se o programa AxioVision (Zeiss, Alemanha), nos aumentos de 40x e 100x.

Os cortes foram avaliados em análises de duplo-cego com relação à lesão pulmonar, a qual foi graduada de 0 (normal) a 4 (severa) em 3 categorias: inflamação intersticial, congestão vascular e edema. A pontuação de lesão pulmonar (escore histopatológico) foi calculada pela soma das pontuações individuais de cada categoria (ITOH et al., 2007). Também foi determinado o número de leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PM) presentes no tecido pulmonar em 10 campos aleatórios não coincidentes.

4.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 4.0. As análises foram realizadas por meio da análise multivariada de Kruskal-Wallis, seguido de um pós teste de Dunn. A análise estatística da carga bacteriana foi realizada utilizando a análise de variância, seguido de um pós teste de Tukey. A análise estatística da curva de mortalidade foi realizada utilizando o teste de Kaplan Meyer. O nível mínimo de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

As proteínas totais da *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram extraídas e separadas por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). O perfil eletroforético obtido após a separação é apresentado na Figura 5. É possível observar a presença de proteínas de diversos tamanhos, indicando a presença de diferentes proteínas no extrato antigênico obtido.

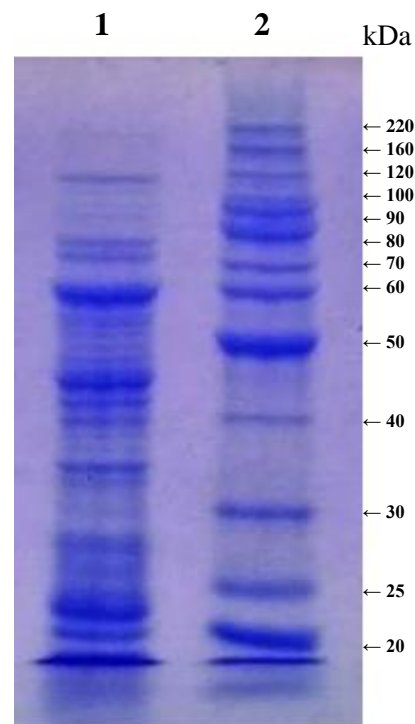


Figura 5- Perfil eletroforético obtido pela separação das proteínas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). A canaleta 1 contém as proteínas extraídas da *P. aeruginosa* ATCC 27853 e a canaleta 2 contém o padrão molecular.

Fonte: Da autora

Os antígenos obtidos da *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram empregados para o preparo das nanoesferas de BSA, através do método de coacervação. A análise de DLS e Laser Doppler, mostrou que as NPPa sintetizadas tiveram um diâmetro médio de $272,5 \pm 12,73$ nm e um potencial Zeta médio de -44 mV, sendo que estes valores foram muito próximos aos valores de $261,7 \pm 17,25$ nm e -32 mV obtidos para a NPV (TABELA 1). Com relação ao índice de polidispersão, os valores encontrados foram $0,3334 \pm 0,119$ e $0,2864 \pm 0,080$ para as NPPa e NPV, respectivamente. A Figura 6 mostra as imagens de AFM das NPs e conforme esperado, as NPs produzidas possuem formato esférico.

Tabela 1 – Diâmetro médio, potencial Zeta e índice de polidispersão das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) obtidos pela técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS) e Laser Doppler.

	Diâmetro Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Polidispersão
NPPa	272,5 ± 12,73	-44	0,3334 ± 0,119
NPV	261,7 ± 17,25	-32	0,2864 ± 0,080

Fonte: Da autora.

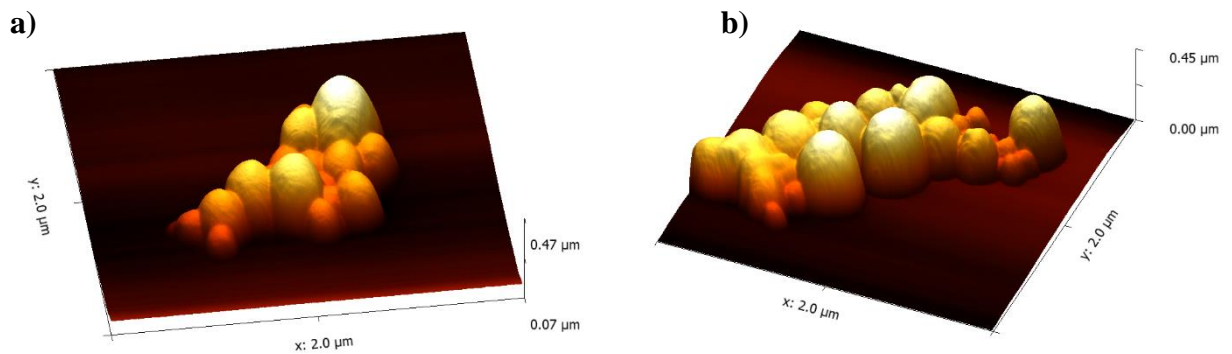


Figura 6– Caracterização morfológica por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM) das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) produzidas:

- Imagem 3D das nanopartículas vazias (NPV) em uma área de 2.0 x 2.0 μm gerada pela AFM.
- Imagem 3D das nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) em uma área de 2.0 x 2.0 μm gerada pela AFM.

Fonte: Da autora.

Também foi avaliada a taxa de captura das NPs fluorescentes pelas células RAW 264.7 e BHK-21. Ambos os tipos celulares se mostraram aptos a internalizar as NPs, porém foi detectada diferença na porcentagem de captura. Após 4 horas de incubação com as NPs fluorescentes, 99,6% e 99,09% das células RAW 264.7 haviam internalizado as NPV e NPPa, respectivamente. Após 24 horas, 100% e 98,12% das células RAW 264.7 capturaram as NPV e NPPa, respectivamente. A porcentagem de células BHK-21 que internalizaram as NPV e NPPa para o tempo de 4 h foi de 27% e 34%, respectivamente, enquanto que para o tempo de 24 horas houve um aumento moderado na porcentagem de células positivas, 66% e 45%, respectivamente (FIGURA 7). A Figura 8 mostra imagens representativas das NPV e NPPa internalizadas pelas células BHK-21 e RAW 264.7.

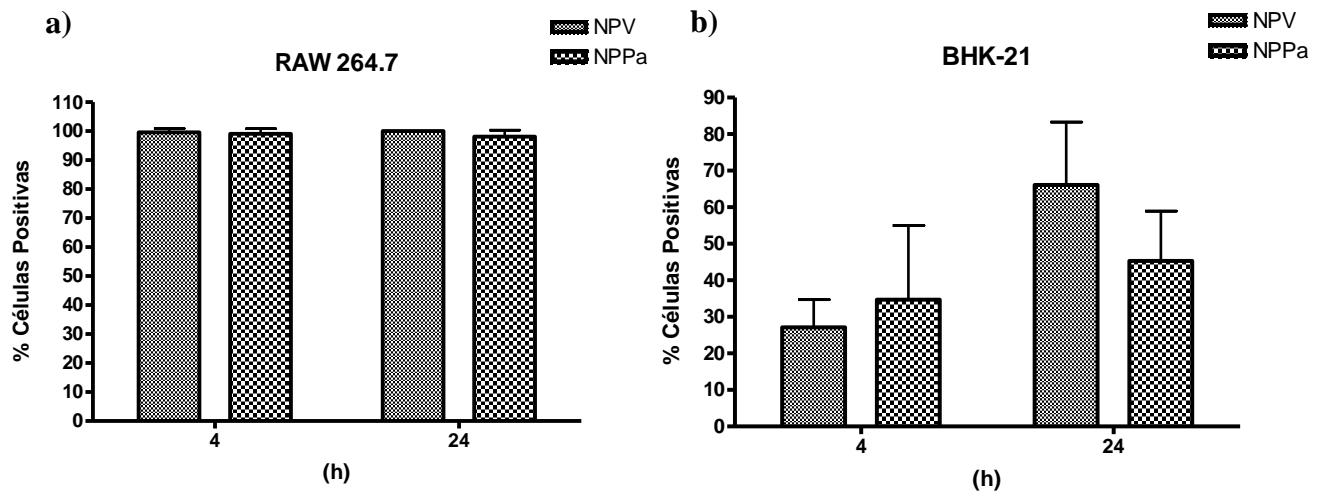


Figura 7– Taxa de captura das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) fluorescentes por células RAW 264.7 e BHK-21:

- Taxa de captura das nanopartículas vazias (NPV) e nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) pelas células RAW 264.7 nos tempos de 4 e 24 h.
- Taxa de captura das nanopartículas vazias (NPV) e nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) pelas BHK-21 nos tempos de 4 e 24 h.

Fonte: Da autora.

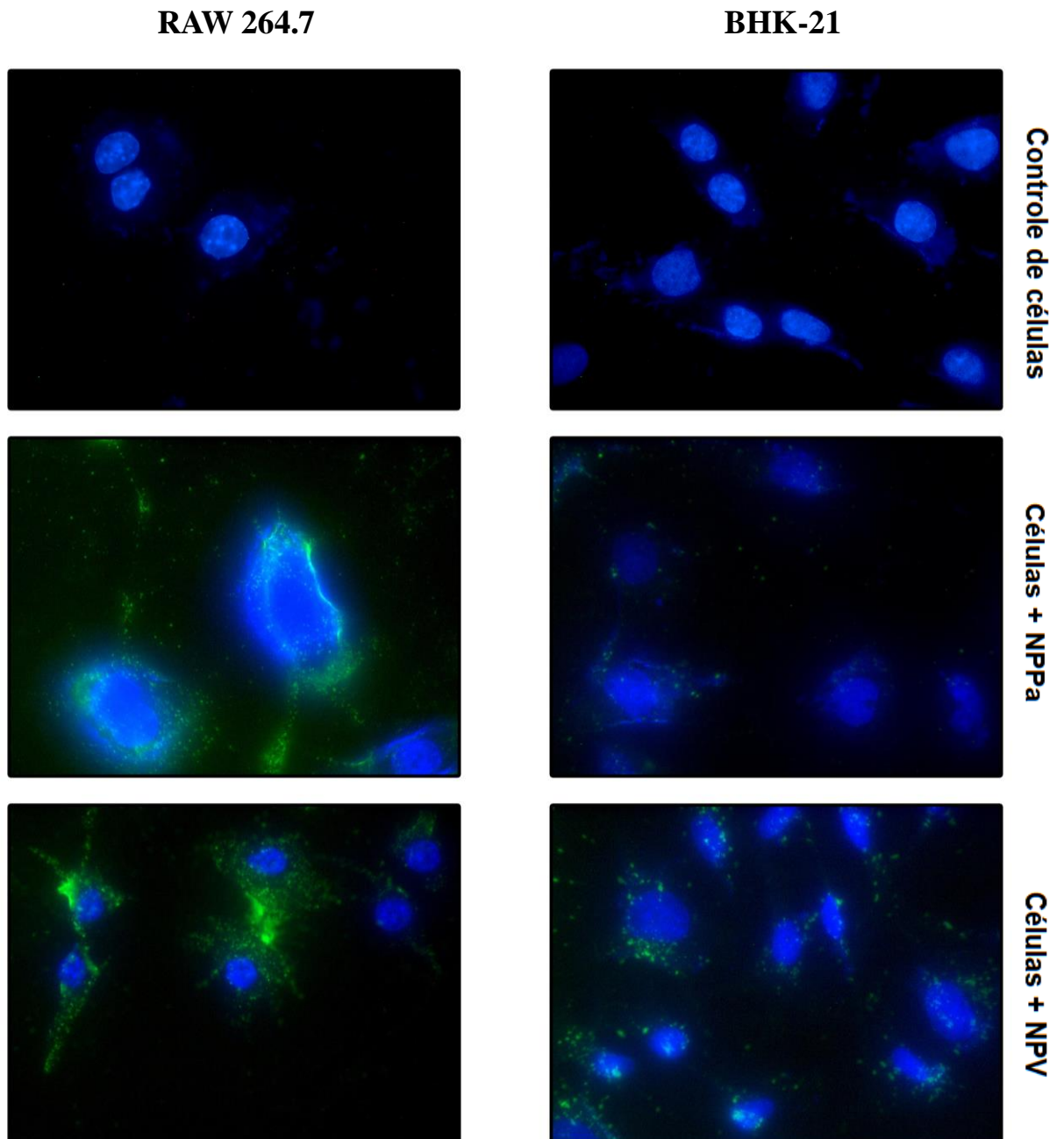


Figura 8– Imagens representativas obtidas por meio de microscopia de fluorescência das células BHK-21 e RAW 264.7 incubadas com as nanopartículas (NPs) fluorescentes. Em azul, núcleo das células RAW 264.7 e BHK-21 coradas com bisbenzimidida. Em verde, NPs coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Essas imagens foram obtidas de células BHK-21 e RAW 264.7 incubadas durante 24 horas com as NPs. Imagens obtidas com aumento de 100X.

Fonte: Da autora.

Além de avaliar a taxa de captura das NPs, também se analisou o potencial citotóxico das NPs e das PPa em células RAW 264.7 e BHK-21 (FIGURA 9).

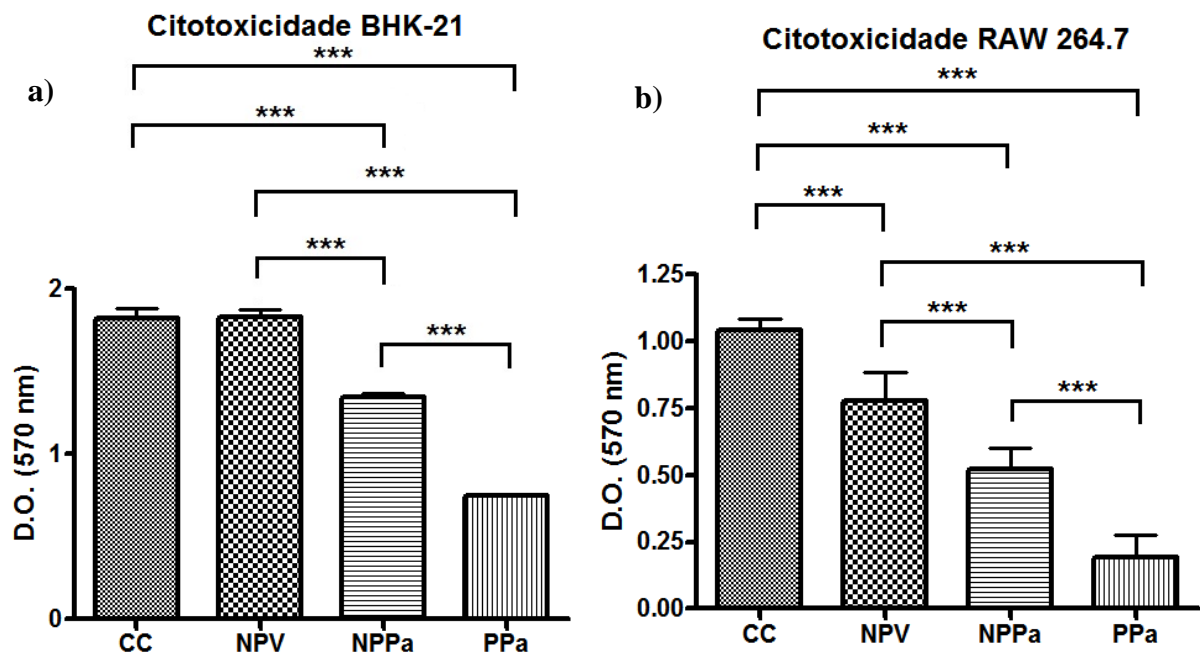


Figura 9– Avaliação do potencial citotóxico das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) produzidas e também das proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) utilizando células BHK-21 e RAW 264.7:

a) Análise da citotoxicidade em células BHK-21 e b) RAW 264.7 após 48 horas de tratamento com as NPs ou com as PPa. *** indica significância de $P < 0,001$. (CC) Controle de células; (NPV) Nanopartículas vazias; (NPPa) Nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa*; (PPa) Proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Fonte: Da autora.

Nota-se que nos dois tipos celulares testados, as PPa se mostraram mais citotóxicas do que em comparação com a NPPa. Também se observa que na presença de NPPa, houve maior morte celular quando comparado com as NPV. Entretanto, ao examinar a viabilidade das células quando tratadas com as NPV, percebe-se uma variação nos tipos celulares, com maior sobrevivência de células BHK-21, apresentando D.O. semelhante ao do controle de células (CC), indicando a não citotoxicidade das NPs de BSA vazias.

Também se analisou a citotoxicidade das PPa e das proteínas totais de *P. aeruginosa* PA14 sobre as células RAW 264.7, durante um período de 24 horas. A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi de $59,41 \pm 8,89 \mu\text{g/mL}$ para as proteínas totais de *P. aeruginosa* PA14 e de $121,85 \pm 19,38 \mu\text{g/mL}$ para as PPa.

As NPs produzidas foram utilizadas para a imunização de camundongos *Swiss* fêmeas de 6-8 semanas de idade pela via subcutânea, com o intuito de avaliar se elas são capazes de elicitar a produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA.

Os animais imunizados com PPa apresentaram alta produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*. Esta produção foi significativamente maior se comparado com os animais do

grupo PBS ($p < 0,001$), NPV ($p < 0,001$) e NPPa ($p < 0,05$). Os animais imunizados com NPPa também foram capazes de produzir anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*, com uma diferença estatisticamente significativa de anticorpos quando comparado com o grupo PBS ($p < 0,01$) (FIGURA 10a).

Já com relação aos anticorpos IgG anti-BSA, observou-se que os animais imunizados com NPPa apresentaram uma produção significativamente maior se comparado com os animais imunizados com PBS ($p < 0,01$) e com os animais imunizados com PPa ($p < 0,001$). Os animais que receberam NPV também produziram IgG anti-BSA, produção essa significativamente maior que a registrada para o grupo imunizado com PBS ($p < 0,05$) e para o grupo imunizados com PPa ($p < 0,01$) (FIGURA 10b).

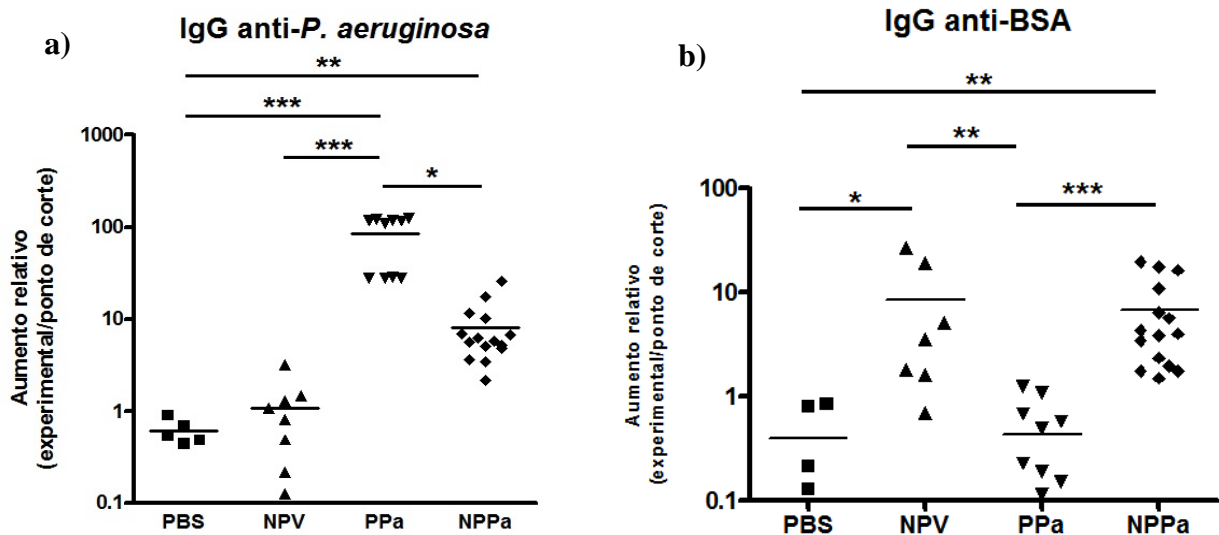


Figura 10– Produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA em camundongos imunizados com tampão fosfato salina (PBS), com nanopartículas vazias (NPV), com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) ou com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa). Cada ponto corresponde a um animal. Os gráficos são representações dos resultados de 3 experimentos independentes:

- Produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* por camundongos imunizados PBS (n=5), com NPV (n=8), PPa (n=11) ou com NPPa (n=15). *** indica significância de $P < 0,001$; ** indica significância de $P < 0,01$; * indica significância de $P < 0,05$.
- Produção de anticorpos IgG anti-BSA por camundongos imunizados com PBS (n=5), NPV (n=7), com PPa (n=11) ou com NPPa (n=15). *** indica significância de $P < 0,001$; ** indica significância de $P < 0,01$; * indica significância de $P < 0,05$.

Fonte: Da autora.

Também foi realizada a titulação de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA. Como o esperado, não foi detectado título de IgG anti-*P. aeruginosa* no soro dos animais que receberam PBS. Os animais imunizados com NPPa e PPa apresentaram os maiores títulos, ≥ 3200 e 150, respectivamente, sendo que no soro dos camundongos que receberam NPV,

também foram detectados anticorpos, porém com título menor. Já a titulação de anticorpos anti-BSA nos grupos de animais imunizados com as NPs, revelou títulos de 450 e 300 para os grupos NPV e NPPa, respectivamente. Em contraste, os animais que não receberam as NPs (PBS e PPa), não apresentaram anticorpos anti-BSA (TABELA 2).

Tabela 2 – Título dos anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e anti-BSA detectados nos soros dos animais imunizados

Grupo	Título IgG anti-<i>P. aeruginosa</i>	Título IgG anti-BSA
PBS	0	0
NPV	25	450
PPa	≥ 3200	0
NPPa	150	300

Fonte: Da autora.

Para avaliar o potencial protetor das preparações contra a infecção causada pela cepa virulenta de *P. aeruginosa*, os camundongos imunizados com PBS, NPV, NPPa ou com PPa foram desafiados duas semanas após a última imunização com a cepa *P. aeruginosa* PA14.

No período de 48 horas após a infecção, apenas 20% dos animais que receberam PBS permaneceram vivos. Já no grupo que recebeu NPV, cerca de 10% dos animais sobreviveram, assim como no grupo de animais imunizados com PPa. A maior taxa de sobrevivência foi registrada no grupo que recebeu NPPa, sendo que cerca de 50% dos animais permaneceram vivos após o desafio. A sobrevivência dos animais imunizados com NPPa foi significativamente maior se comparado com a sobrevivência dos animais do grupo PBS ($p < 0,05$), NPV ($p < 0,05$) e PPa ($p < 0,01$) (FIGURA 11).

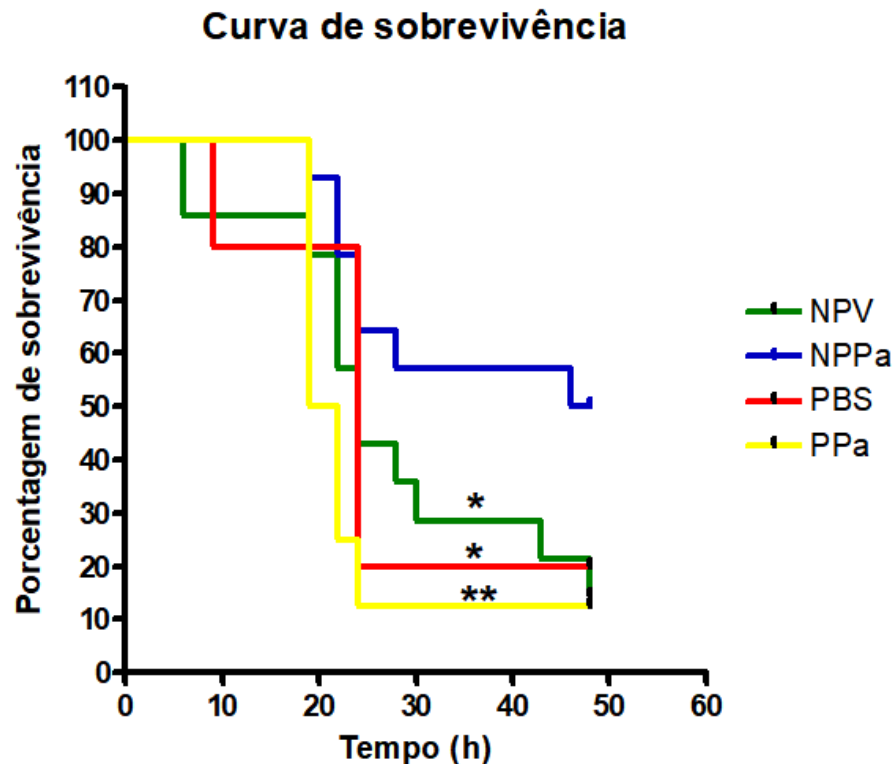


Figura 11– Curva de sobrevivência dos animais imunizados com tampão fosfato salina (PBS) (n=5), com nanopartículas vazias (NPV) (n=14), com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) (n=8) ou com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) (n=14), e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14, dentro de 48 horas. Esta curva representa os resultados de 3 experimentos independentes. ** indica significância de $P < 0,01$ com relação ao grupo NPPa; * indica significância de $P < 0,05$ com relação ao grupo NPPa.

Fonte: Da autora.

Ao se realizar a determinação da carga bacteriana nos pulmões, observou-se variações nos valores de UFC/mg de tecido entre os diferentes grupos. O maior valor de carga bacteriana foi observado no grupo imunizado com PBS, com uma média de $2,6 \times 10^6$ UFC/mg de tecido, seguido do grupo de animais que recebeu NPV, com uma média de $4,9 \times 10^5$ UFC/mg de tecido, e seguido do grupo imunizado com PPa, com uma média de $2,6 \times 10^5$ UFC/mg de tecido. A menor carga bacteriana foi registrada no grupo imunizado com NPPa, com uma média de $3,8 \times 10^4$ UFC/mg de tecido (ANEXO A) (FIGURA 12).

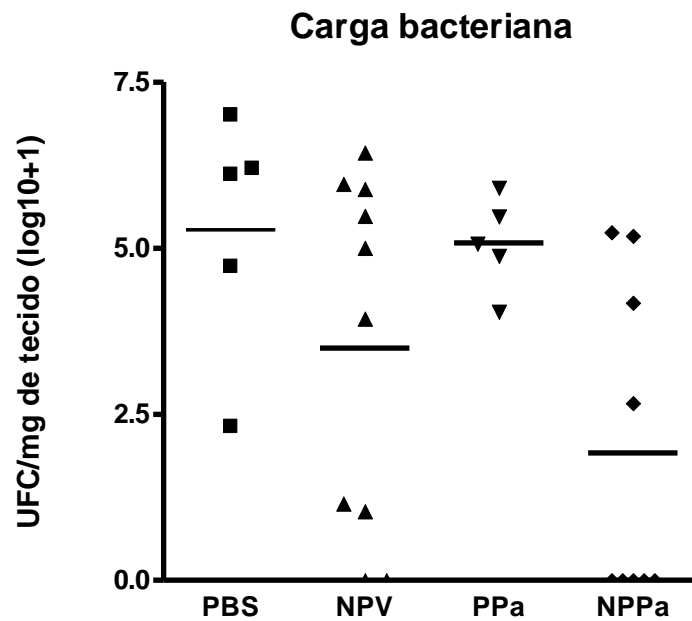


Figura 12– Carga bacteriana nos pulmões dos animais que foram imunizados com tampão fosfato salina (PBS) (n=5), com nanopartículas vazias (NPV) (n=10), proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) (n=5) ou com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) (n=9), e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14. Os valores de carga bacteriana estão representados na forma de $\log_{10}+1$. Este gráfico representa os resultados de 3 experimentos independentes.

Fonte: Da autora.

Além de se avaliar a sobrevivência dos animais e a carga bacteriana pulmonar nos diferentes grupos após a infecção, outro parâmetro analisado foi a produção das citocinas TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-2, IL-10 e IL-17A no tecido pulmonar dos animais infectados. Os dados mostram que a infecção com a *P. aeruginosa* PA14 induziu uma alta expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 nos pulmões de todos os animais infectados, independentemente do tratamento prévio. Entretanto, os níveis de expressão dessas duas citocinas foram menores nos animais imunizados com NPPa. Os animais desse grupo apresentaram uma produção de TNF- α estatisticamente menor do que se comparado com os animais imunizados com PPa ($p < 0,05$) (FIGURA 13a), e uma produção de IL-6 estatisticamente menor do que se comparado com os animais do grupo PBS ($p < 0,01$) (FIGURA 13b). IFN- γ e IL-17A foram expressos em níveis moderados nos grupos PBS, NPV e NPPa, com uma menor expressão nos animais imunizados com NPPa. Os animais do grupo PPa apresentaram uma produção de IFN- γ significativamente maior do que os animais imunizados com NPV ($p < 0,01$) ou NPPa ($p < 0,01$) (FIGURA 13c), e uma produção de IL-17A significativamente maior dos que os animais dos grupos PBS ($p < 0,001$), NPV ($p < 0,001$) e

NPPa ($p < 0,001$) (FIGURA 13g). IL-2, IL-4 e IL-10 foram detectados em baixas concentrações nos animais imunizados com PBS, NPV e NPPa, não havendo diferença estatística entre esses grupos (FIGURAS 13d, 13e e 13f). Um mapa de aquecimento representando a expressão de todas as citocinas mostrou que os animais imunizados com PPa apresentaram uma expressão aumentada de IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-2 nos pulmões após a infecção (FIGURA 13h).

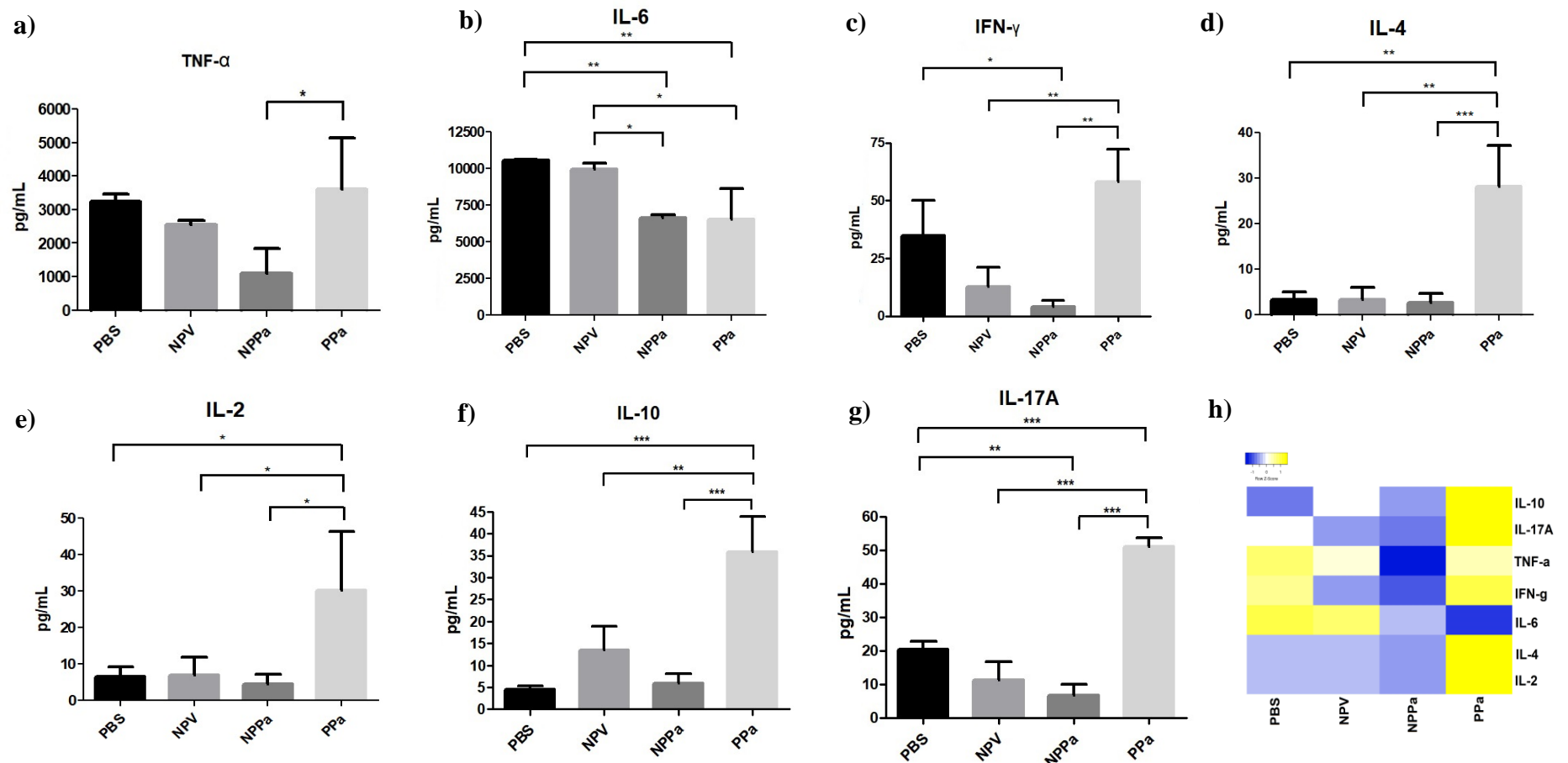


Figura 13– Produção de citocinas nos pulmões de camundongos imunizados com tampão fosfato salina (PBS), com nanopartículas vazias (NPV), com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa) ou com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14:

a) Produção de TNF- α , b) IL-6, c) IFN- γ , d) IL-4, e) IL-2, f) IL-10 e g) IL-17A nos pulmões dos animais imunizados com PBS, NPV, NPPa ou PPa. *** indica significância de $P < 0,001$; ** indica significância de $P < 0,01$; * indica significância de $P < 0,05$

h) Mapa de aquecimento (*Heatmap*) representando a expressão das citocinas IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2 nos animais imunizados PBS, NPV, NPPa ou PPa

Fonte: Dados obtidos pela autora por meio da ferramenta *Heatmapper*. Disponível em: < <http://www1.heatmapper.ca/>>. Acesso em: 06 out 2017.

A análise histopatológica dos pulmões dos animais imunizados e em seguida infectados com a *P. aeruginosa* PA14, demonstra que a lesão tecidual foi mais intensa nos animais tratados com PBS se comparada com os outros grupos (FIGURA 14a). Não foram registradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NPPa, NPV e PPa. As imagens representativas dos cortes histológicos (FIGURA 14d) retratam o escore histopatológico. No grupo PBS, observa-se intenso infiltrado inflamatório intersticial, espessamento do septo alveolar e presença de exsudato, características de edema pulmonar. Observa-se também presença de alguns focos de congestão vascular. Já nos grupos NPPa, NPV e PPa, é possível verificar infiltrado inflamatório intersticial moderado, pouco espessamento do septo alveolar e alguns focos de congestão. Apesar de não existir diferença estatística no escore histopatológico entre esses três grupos, a análise dos cortes dos animais do grupo PPa revelou maior perda da arquitetura alveolar, o que indica maior dano nos pulmões desses animais.

A contagem de células inflamatórias no tecido pulmonar revelou elevada quantidade de células nos pulmões dos animais do grupo PBS, sendo este número significativamente maior se comparado com a contagem nos pulmões dos animais dos grupos NI ($p < 0,001$), NPPa ($p < 0,05$) e NPV ($p < 0,01$). Com relação aos animais imunizados com as NPs ou com as PPa, observou-se uma infiltração leucocitária mais moderada, sem diferença estatística entre esses grupos (FIGURA 14b). A contagem diferencial de células mononucleares e polimorfonucleares no tecido pulmonar demonstra que o infiltrado no tecido pulmonar dos animais do grupo PBS foi predominantemente mononuclear. Nos demais grupos, também se observou um infiltrado predominantemente mononuclear, com infiltrado polimorfonuclear bastante reduzido, principalmente no tecido pulmonar dos animais imunizados com PPa (FIGURA 14c).

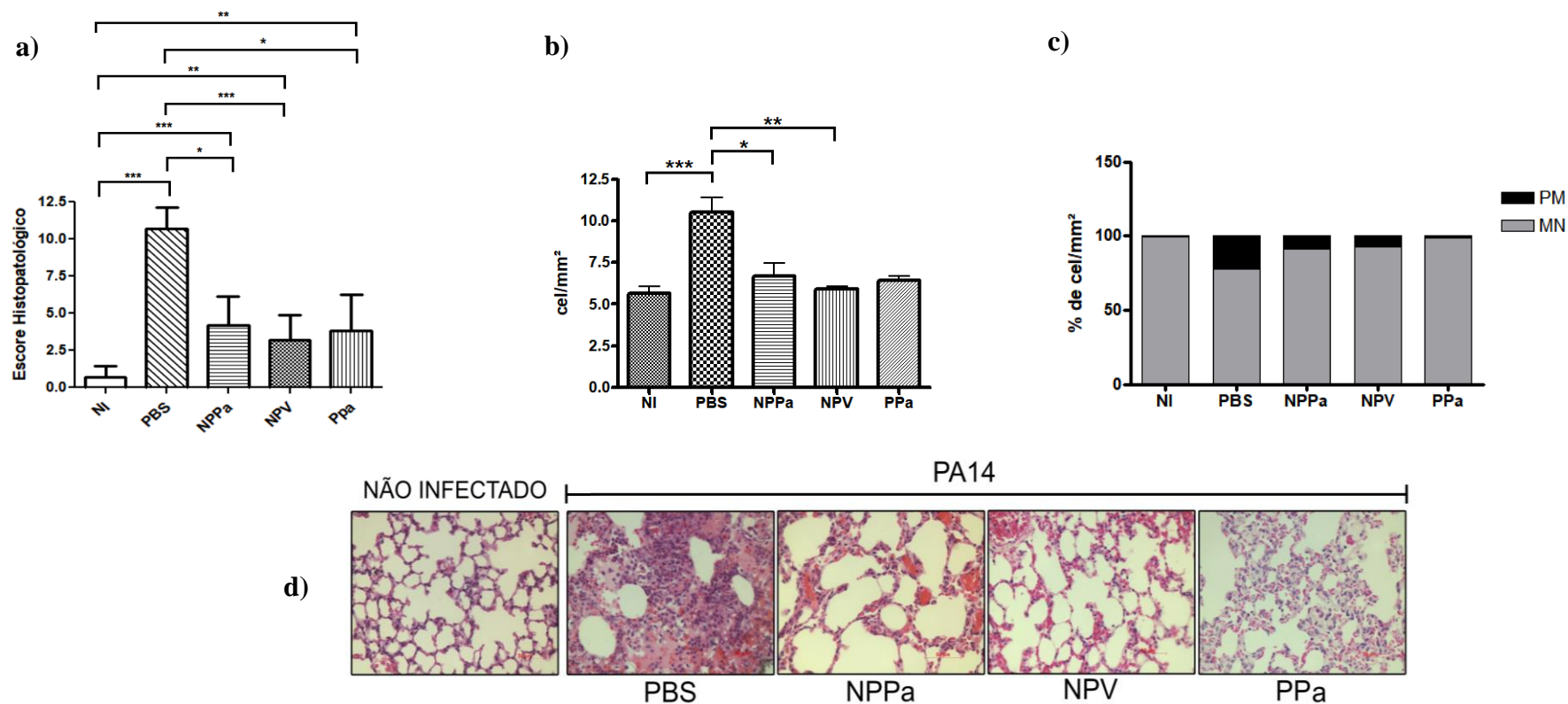


Figura 14– Análise histopatológica dos pulmões esquerdos de camundongos imunizados com tampão fosfato salina (PBS), com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa), com nanopartículas vazias (NPV) ou com proteínas totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PPa) e desafiados com 4×10^9 UFC/mL de *P. aeruginosa* PA14:

- Escore histopatológico dos animais imunizados com PBS, NPPa, NPV ou PPa. NI indica animais não infectados; *** indica significância de $P < 0,001$; ** indica significância de $P < 0,01$; * indica significância de $P < 0,05$
- Total de células por mm^2 no tecido pulmonar de animais imunizados com PBS, NPPa, NPV ou PPa. NI indica animais não infectados; *** indica significância de $P < 0,001$; ** indica significância de $P < 0,01$; * indica significância de $P < 0,05$
- Porcentagem de células mononucleares e polimorfonucleares por mm^2 no tecido pulmonar de animais imunizados com PBS, NPPa, NPV ou PPa. NI indica animais não infectados; MN indica leucócitos mononucleares; PM indica leucócitos polimorfonucleares
- Imagens representativas de cortes do pulmão esquerdo de animais imunizados com PBS, NPPa, NPV ou PPa. NI indica animais não infectados. Imagens obtidas com aumento de 40X

Fonte: Da autora.

6 DISCUSSÃO

Antes de se proceder ao preparo das NPs de BSA, foi realizada a extração das proteínas totais da *P. aeruginosa* ATCC 27853 e sua separação através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Foi possível observar no extrato proteico a presença de proteínas com diferentes pesos moleculares. Como a extração foi realizada com tampão de lise, essas proteínas podem ser originadas de diferentes partes da célula bacteriana. Assim, nesse extrato proteico podem estar presentes proteínas da parede celular, da membrana plasmática e também proteínas intracelulares, incluindo proteínas do flagelo, dos pili e da membrana externa. Visto que a extração se deu por meio de lise celular e não se realizou a purificação das proteínas obtidas, talvez possam ser encontrados no extrato proteico carboidratos e lipídeos, incluindo o LPS bacteriano.

As NPs utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de BSA por meio do método de coacervação. Após o preparo, as NPs foram caracterizadas fisicamente. As análises de AFM mostraram que tanto as NPV quanto as NPPa apresentaram formato esférico, o que já era esperado, visto que outros trabalhos que prepararam NPs por meio da coacervação, também obtiveram partículas esféricas (RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012). A análise de DLS mostrou que as NPPa sintetizadas tiveram um diâmetro médio de $272,5 \pm 12,73$ nm, enquanto que as NPV apresentaram um diâmetro médio de $261,7 \pm 17,25$ nm. NPs de albumina mostram um tamanho que varia geralmente de 50 a 300 nm (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012), sendo que alguns estudos demonstram que essas NPs preparadas a partir de BSA ou HSA, podem apresentar mais de 500 nm (DREIS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012). Assim, os valores de diâmetro médio obtidos estão dentro daqueles encontrados em outros estudos. A variação no tamanho das NPs de albumina pode ser devido às técnicas utilizadas para o preparo e também às diferentes substâncias associadas às NPs. Desse modo, o tamanho relativamente maior das NPPa comparado com as NPV, pode ser explicado pela presença dos antígenos associados.

As NPV e NPPa produzidas neste estudo apresentaram um potencial Zeta de -32 e -44 mV, respectivamente. Valores de potencial Zeta acima de ± 30 mV são importantes para uma boa estabilidade físico-química da suspensão. Assim, estas NPs possuem potenciais Zeta que estão dentro dos considerados ideais para boa estabilidade do sistema coloidal (MOHANRAJ; CHEN, 2006; SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). Os diferentes valores de potencial Zeta encontrados para as NPV e NPPa, podem ser explicados pela presença dos antígenos nas

NPPa, sendo que as proteínas bacterianas associadas às NPs podem apresentar diferentes cargas e assim influenciar o potencial Zeta final das NPPa.

Os valores de índice de polidispersão obtidos para as NPV e NPPa foram de $0,2864 \pm 0,080$ e $0,3334 \pm 0,119$, respectivamente. Verifica-se que as NPV apresentaram índice de polidispersão $<0,3$, o que indica a formação de NPs com tamanhos homogêneos (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2010). Entretanto, registrou-se um índice de polidispersão $>0,3$ para as NPPa, indicando que essa população de NPs pode não ter apresentado uma distribuição de tamanho tão homogênea.

Também foi avaliada a taxa de captura de NPs fluorescentes pelas células RAW 264.7 e BHK-21. Ambos os tipos celulares se mostraram aptos a internalizar as NPs, porém eles mostraram diferenças na porcentagem de captura nos dois tempos analisados. Visto que aproximadamente 100% das células RAW 264.7 foram capazes de capturar as NPs em ambos os tempos testados, percebe-se que a propriedade macrofágica dessas células beneficia a internalização das NPs.

Kuhn e et al. (2014) mostraram que esses nanocarreadores podem ser capturados por mecanismos endocíticos diferentes em células distintas. Visto que as células RAW 264.7 são macrófagos oriundos de camundongos, este tipo celular é capaz de capturar partículas por meio da fagocitose. A fagocitose pode ser induzida pela interação de receptores presentes na superfície celular com ligantes presentes no agente estranho (YAMEEN et al., 2014). Os receptores glicoproteicos gp18 e gp30 reconhecem albumina e estão presentes na superfície de macrófagos (MERLOT; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2014). Apesar de existirem vários receptores para albumina nas diferentes células, é necessário caracterizar qual receptor é responsável pela internalização das NPs de BSA nas células RAW 264.7 e BHK-21.

As células RAW 264.7 e BHK-21 também foram utilizadas em ensaios de citotoxicidade das NPs produzidas. Observou-se que nos dois tipos celulares testados, as PPa apresentaram maior citotoxicidade do que comparado com as NPPa. Mesmo que não comprovada a presença de LPS bacteriano no extrato proteico obtido, este pode estar presente, visto que o extrato proteico não foi submetido a um tratamento que remova LPS. A possível presença de LPS e das próprias proteínas bacterianas no extrato, pode ter sido responsável pela maior citotoxicidade inerente às PPa. O efeito tóxico do LPS presente juntamente com as proteínas bacterianas, provavelmente foi contornado pelo seu encapsulamento nas NPs de BSA, o que explicaria a menor citotoxicidade das NPPa quando comparado com as PPa. Observa-se também que em ambos os tipos celulares, as NPPa induziram maior citotoxicidade quando comparado com as NPV. Isso pode ter ocorrido devido à associação das NPs com os

antígenos totais da *P. aeruginosa*. Ao analisar a viabilidade das células tratadas com as NPV, verifica-se uma variação da resposta nos dois tipos celulares, com menor citotoxicidade da NPV nas células BHK-21 do que nas células RAW 264.7.

Quando se analisa o efeito citotóxico das PPa nos dois tipos celulares, nota-se que o extrato proteico foi mais tóxico para as células RAW 264.7 do que para as células BHK-21. Estímulos inflamatórios, como o LPS, podem induzir lesão tecidual por meio da produção de ROS. As ROS, apesar de serem importantes para a defesa do hospedeiro contra diferentes patógenos, também são responsáveis por lesão tecidual, uma vez que causam a oxidação de lipídeos e proteínas que fazem parte das células hospedeiras (MAITRA et al., 2009; MENON et al., 2015). Diante disso, embora a produção de ROS não tenha sido mostrada, presume-se que o tratamento das células RAW 264.7 com as PPa pode estar levando à produção dessas espécies reativas, as quais são capazes de causar danos à cultura celular. Como as células BHK-21 provavelmente não são produtoras de ROS, o tratamento dessas células com PPa não foi tão prejudicial quando comparado com o tratamento das células macrofágicas.

As células RAW 264.7 também foram utilizadas para investigar a diferença de citotoxicidade entre as proteínas da *P. aeruginosa* ATCC 27853 e da *P. aeruginosa* PA14 em um período de 24 horas. Por meio da determinação da CC₅₀, observou-se que o extrato proteico da *P. aeruginosa* PA14 foi cerca de duas vezes mais citotóxico para as células RAW 264.7 do que o extrato proteico da *P. aeruginosa* ATCC 27853. Apesar de não termos investigado quais fatores de virulência estavam presentes nesses extratos, é provável que no extrato proteico da PA14 estivessem presentes fatores de virulência que são ausentes no extrato proteico da ATCC 27853. Isso explicaria então a maior citotoxicidade do extrato da PA14 na presença das células RAW 264.7. Esses dados mostram que a escolha em se utilizar proteínas de uma cepa não virulenta em uma preparação vacinal, é preferível frente ao uso de proteínas de uma cepa virulenta, visto que as proteínas da cepa não virulenta podem induzir proteção contra desafio com cepa virulenta sem levar a danos no hospedeiro.

Após os ensaios *in vitro* das NPs, foi avaliado o potencial imunogênico dessas preparações medindo-se a produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* em camundongos *Swiss* imunizados. A injeção subcutânea é umas das rotas mais indicadas para a entrega de antígenos, pois estes podem ser drenados do local de injeção para os linfonodos, onde as células T e B residem e assim iniciam a resposta imune adquirida (OUSSOREN; STORM 2001; PITAKSUTTEEPONG, 2005). Visto que as NPs produzidas possuem um tamanho superior a 100 nm, provavelmente são capturadas pelas DCs presentes no tecido subcutâneo, as quais então migram para os capilares linfáticos (PITAKSUTTEEPONG, 2005), chegando

aos linfonodos, onde ativarão as células T “naive”. A degradação da matriz polimérica das NPs, com a consequente liberação dos antígenos dispersos na matriz, pode ocorrer no local de administração, de modo que os antígenos livres chegarão aos linfonodos e também serão reconhecidos pelas células B “naive”. Entretanto, visto que a população de NPs não tem um tamanho totalmente homogêneo, pode haver a presença de NPs menores, que chegarão aos linfonodos sem terem sido fagocitadas pelas DCs. Nos linfonodos, os linfócitos B podem reconhecer antígenos que estejam presentes na superfície das NPs, ou reconhecer os antígenos liberados pela degradação da matriz polimérica.

Após os ensaios de imunização, verificou-se que os animais imunizados com PPa apresentaram alta produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* se comparado à produção de IgG nos animais imunizados com NPPa. O trabalho de Rodrigues et al. (2013) também analisou a presença de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*P. aeruginosa* no soro dos animais imunizados com NPPa. Os resultados obtidos por eles mostraram altos títulos de IgG1 no soro dos grupos NPPa e PPa, enquanto que apenas os animais imunizados com NPPa produziram títulos significativos de IgG2a.

Dunkley et al. (2003) desenvolveram um estudo para avaliar o papel de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* na proteção contra a bactéria em um modelo animal de infecção pulmonar aguda. Assim, neste estudo, ratos não tratados receberam diferentes concentrações de anticorpos IgG total preparados a partir do soro de animais previamente imunizados com a *P. aeruginosa* inativada, e em seguida foram infectados pela via intratraqueal com a *P. aeruginosa*. Observou-se que os ratos que receberam a preparação de IgG imune mostraram grande eliminação da bactéria no lavado broncoalveolar, além de apresentarem anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b anti-*P. aeruginosa* no soro e no lavado broncoalveolar. Outro achado foi o recrutamento de neutrófilos para as vias respiratórias dos animais que receberam IgG imune.

Apesar de não termos investigado a produção de diferentes subclasses de IgG no nosso estudo, a imunização dos camundongos com NPPa provavelmente induziu a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*P. aeruginosa*, assim como no estudo de Rodrigues et al. (2013). Essas subclasses de anticorpos IgG podem ter função protetora no modelo de infecção aguda estabelecido, assim como o observado nos estudos de Dunkley et al. (2003). Uma das prováveis hipóteses de proteção, é que os anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* levem ao recrutamento de leucócitos para os pulmões, via ativação do sistema complemento, e por meio da opsonização das bactérias, facilite a sua fagocitose e morte pelos leucócitos recrutados.

Entretanto, também deve-se considerar o papel da imunidade celular na eliminação da bactéria, como o mediado pelas células Th17 (LIU et al., 2011).

Os animais imunizados com as diferentes formulações também foram analisados quanto a produção de anticorpos IgG anti-BSA. Verificou-se que somente os animais imunizados com NPV e com NPPa foram capazes de produzir anticorpos IgG anti-BSA. Esse resultado indica que além de poder possuir potencial adjuvante, as NPs de BSA também foram imunogênicas, induzindo uma resposta imune humoral anti-BSA. Um dos possíveis efeitos dos anticorpos anti-BSA seria a opsonização das NPs, o que aumentaria a sua fagocitose pelas células fagocíticas. Uma vez fagocitadas pelas APCs, o antígeno vacinal associado às NPs de BSA poderia ser apresentado mais eficientemente pela via de MHC de classe II às células T CD4 nos linfonodos (DOBROVOLSKAIA et al., 2008).

A fim de se avaliar o potencial protetor das preparações contra a infecção causada pela cepa virulenta de *P. aeruginosa*, os camundongos dos diferentes grupos foram desafiados pela via nasal com a cepa PA14. Apesar de o soro dos animais imunizados com NPPa ter apresentado menor título de anticorpos anti-*P. aeruginosa* do que comparado com o soro dos animais imunizados com PPa, este grupo foi o que apresentou a maior porcentagem de sobrevivência e a menor carga bacteriana média nos pulmões dentro do tempo estudado.

Apesar de a imunização dos camundongos com PPa ter induzido os maiores títulos de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*, essa elevada produção de anticorpos não correspondeu ao menor valor de carga bacteriana pulmonar e nem à maior porcentagem de sobrevivência dos animais infectados dentro do tempo estudado. Isso indica que a alta produção de anticorpos induzida pela imunização dos animais com PPa não levou a uma resposta protetora contra a infecção. Evento semelhante já foi observado em outros estudos, em que a imunização com dado candidato vacinal eliciu alta produção de anticorpos, os quais não foram protetores no modelo estudado (DABO et al., 2008; CASAIS et al., 2016; MCCORMICK et al., 1992; NAZOUKI et al., 2009).

Alta produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa* e ausência de proteção também é verificada em pacientes com FC que sofrem de infecção crônica com a *P. aeruginosa*. Os anticorpos induzidos pela infecção não protegem os pacientes da bactéria, e ainda se correlacionam com pior prognóstico (HØIBY, 2001).

A infecção pulmonar causada pela *P. aeruginosa* induz uma produção elevada de diversas citocinas, tais como TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1, as quais são importantes para o recrutamento e ativação de neutrófilos. Os neutrófilos podem favorecer o processo de eliminação da infecção, mas também podem mediar a lesão tecidual (JAIN-VORA et al.,

1998). Por um lado, a inflamação é essencial para a resolução da infecção, visto que leva ao recrutamento de leucócitos e proteínas plasmáticas para o sítio da infecção. Por outro lado, a inflamação pode causar lesão, principalmente pela elevada produção de citocinas, mediadores inflamatórios, ROS e proteases pelas células inflamatórias recrutadas (MIZGERD, 2008; SKERRETT et al., 1999). Uma elevada produção de mediadores inflamatórios pode levar ao recrutamento excessivo de células inflamatórias para o sítio da infecção e à disfunção endotelial, caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A disfunção endotelial está relacionada à hipotensão, extravasamento vascular, hemoconcentração e edema (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). A lesão tecidual que pode acompanhar a inflamação é extremamente danosa, principalmente quando ocorre nos pulmões, coração, fígado e rins. A inflamação nesses órgãos pode conduzir progressivamente à disfunção, devido à lesão no parênquima do órgão (PEREIRA, 2013).

Desse modo, durante uma infecção pulmonar aguda causada pela *P. aeruginosa*, como é o caso do modelo em estudo, a resposta inflamatória do hospedeiro, a qual inclui a produção de mediadores inflamatórios, deve ser fortemente regulada, de modo a assegurar uma eliminação efetiva do patógeno e prevenir a imunopatologia (WONNENBERG et al., 2016).

Neste estudo foi possível observar que a produção tanto de citocinas pró-inflamatórias, quanto de citocinas anti-inflamatórias, variou entre os diferentes grupos (FIGURA 13). De maneira geral, verifica-se uma produção mais controlada dessas citocinas nos animais imunizados com as NPPa, NPV ou PBS, e uma produção exacerbada nos animais que receberam PPa. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-2, foram significativamente mais elevados nos animais imunizados com PPa, do que se comparado com os animais imunizados com NPPa.

Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões dos animais imunizados com PPa demonstram que um fenômeno conhecido como “tempestade de citocinas” pode ter ocorrido nos pulmões desses animais em resposta à infecção. Este fenômeno, que é definido como uma liberação de citocinas pró-inflamatórias, está relacionado à produção de diversas citocinas, tais como o IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-1 β e o TNF- α . A inflamação associada com uma “tempestade de citocinas” pode ter início local, e subsequentemente se espalhar pelo organismo, produzindo sepse sistêmica (TISONCIK et al., 2012). A sepse, que é a presença de micro-organismos na corrente sanguínea, tem como característica marcante uma resposta inflamatória sistêmica, e se desenvolve quando a resposta imune contra a infecção se torna exagerada e desregulada. Uma liberação desregulada de citocinas pode levar à disfunção da barreira endotelial. Essa disfunção endotelial permite que os patógenos e seus produtos, como

o LPS, invadam a corrente sanguínea do hospedeiro, podendo causar então a disfunção de vários órgãos (DENK; PERL; HUBER-LANG, 2012; SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Apesar de não termos investigado a disseminação da *P. aeruginosa* a partir do pulmão para a corrente sanguínea e outros órgãos, é possível que a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias pelos animais do grupo PPa após a infecção, tenha induzido sepse e conseqüentemente a morte dos animais.

Deve-se ressaltar também o fato de que algumas citocinas presentes em altos níveis no tecido pulmonar dos animais do grupo PPa têm atividade pró-apoptótica, tais como o TNF- α , IL-6 e IL-10 (COX, 1996; KAPLANSKI et al., 2003; SKERRET et al., 1999). Assim, apesar de não termos investigado a apoptose de leucócitos no infiltrado celular, a presença dessas citocinas nos pulmões dos animais do grupo PPa pode estar causando a apoptose de células importantes para a eliminação bacteriana, tais como os neutrófilos, o que conseqüentemente prejudica a depuração da bactéria presente nos pulmões.

Além de uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, os animais do grupo PPa também apresentaram os maiores níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. A IL-10 é importante para o término do processo inflamatório, uma vez que inibe a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-18 (COX, 1996; MOORE et al., 2001). Assim, a alta produção de IL-10 vista nesses animais pode ter ocorrido como uma tentativa do sistema imunológico em controlar a síntese e liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias.

De acordo com Grassmé et al. (2006), a liberação moderada de citocinas nos pulmões é necessária para a eliminação da *P. aeruginosa* após a infecção pulmonar, enquanto que uma liberação exacerbada pode resultar em sepse e morte.

Por meio da análise histopatológica dos pulmões dos animais imunizados e infectados, registrou-se um alto escore histopatológico para o grupo PBS, revelando intensa lesão pulmonar nesses animais, representada por alterações do parênquima pulmonar. Visto que os animais do grupo PBS apresentaram uma produção controlada de citocinas, fica claro que as alterações histopatológicas não foram resultantes da ação de citocinas, mas que podem ter sido resultado da ação direta da bactéria sobre o tecido pulmonar. Em contraste com o grupo PBS, as análises dos cortes dos animais dos grupos NPPa, NPV e PPa revelaram menor grau de lesão tecidual. Apesar de os animais imunizados com NPV não apresentarem uma imunidade específica que os proteja da infecção causada pela *P. aeruginosa*, observou-se a presença de poucas alterações histopatológicas, o que pode ser explicado por uma ação imunomoduladora não específica das NPs.

Quando diversos parâmetros são analisados em conjunto, tais como produção de citocinas, carga bacteriana e sobrevivência, observam-se respostas divergentes entre os diferentes grupos. Os animais dos grupos PBS e NPV, apresentaram uma produção moderada de citocinas nos pulmões, carga bacteriana elevada e baixa taxa de sobrevivência após a infecção. Já os animais imunizados com NPPa apresentaram uma produção moderada de citocinas, menor carga bacteriana e maior sobrevivência. Os animais imunizados com PPa, apresentaram uma produção exagerada de citocinas nos pulmões, maior carga bacteriana pulmonar e menor taxa de sobrevivência após a infecção.

Portanto, a partir dos dados obtidos, verifica-se que a imunização com as NPPa foi protetora no modelo de infecção por *P. aeruginosa* PA14. Essa proteção foi representada por uma produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* e de mediadores inflamatórios em níveis moderados, os quais podem ter influenciado a redução na carga bacteriana e a menor taxa de mortalidade observada nestes animais.

7 CONCLUSÃO

Obteve-se sucesso na produção das nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos de *P. aeruginosa* ATCC 27853. A imunização de camundongos com estas nanopartículas foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*, o que pode ter contribuído para a redução da carga bacteriana e da taxa de mortalidade nos animais infectados com a cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14. A imunização dos animais com essa formulação também foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar após a infecção. Sendo assim, as nanopartículas associadas aos antígenos de uma cepa não virulenta de *P. aeruginosa* se mostraram um candidato promissor para o desenvolvimento de vacinas contra a *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, P. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Holanda, v. 61, n. 6, p. 428-437, 2009.
- AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. **Advances in Polymer Science**, Alemanha, v. 247, p. 31-64, 2012.
- ALLEN, L. et al. Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo. **The Journal of Immunology**, EUA, v. 174, p. 3643–3649, 2005.
- ALLEWELT, M. et al. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. **Infection and Immunity**, EUA, v. 68, n. 7, p. 3998-4004, 2000.
- AUDETTE, G. F.; IRVIN, R. T.; HAZES, B. Crystallographic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* strain K122-4 monomeric pilin reveals a conserved receptor-binding architecture. **Biochemistry**, EUA, v. 43, n. 36, p. 11427–11435, 2004.
- BRAGONZI, A. et al. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. **The Journal of Infectious Diseases**, EUA v. 192, p. 410-419, 2005.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, Holanda, v. 19, n. 8, p. 419–426, 2011.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C. *Pseudomonas, Acinetobacter* e bactérias Gram-negativas incomuns. In: BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica**. Porto Alegre: McGraw-Hill/LANGE, 2009. cap. 17, p. 263-269.
- BULLA, L. A. Bacteria as insect pathogens. **Annual review of microbiology**, EUA, v. 29, n. 6, p. 163–190, 1975.
- CARROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nature Immunology**, Reino Unido, v. 5, n. 10, p. 981-986, 2004.
- CASAI, R. et al. Vaccination of rabbits with immunodominant antigens from *Sarcoptes scabiei* induced high levels of humoral responses and pro-inflammatory cytokines but confers limited protection. **Parasites and Vectors**, Reino Unido v. 9, n. 435, p. 1-13, 2016.
- CASTRIC, P. A.; DEAL, C. D. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* pili based on sequence and B- cell epitope analyses. **Infection and Immunity**, EUA, v. 62, n. 2, p. 371–376, 1994.
- CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer

particles. **Pharmaceutical Research**, EUA, v. 26, n. 1, p. 244–249, 2009.

CHEN, T. Y. et al. A Nontoxic *Pseudomonas* Exotoxin A Induces Active Immunity and Passive Protective Antibody against *Pseudomonas* Exotoxin A Intoxication. **Journal of Biomedical Science**, Suíça, v. 6, p. 357-363, 1999.

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

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, Reino Unido, v. 422, p. 37-44, 2003.

COX, G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. **The American Journal of Physiology**, EUA, v. 271, p. 566-57, 1996.

CRIPPS, A. W. et al. Safety and Immunogenicity of an oral inactivated whole-cell *Pseudomonas aeruginosa* vaccine administered to healthy human subjects. **Infection and Immunity**, EUA, v. 74, n. 2, p. 968-974, 2006.

CRYZ, S. J. et al. Safety and Immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide Toxin A Conjugate Vaccine in Humans. **Journal of Clinical Investigation**, EUA, v. 80, p. 51–56, 1987.

CUI, Z. et al. Mannose-modified chitosan microspheres enhance OprF-OprI-mediated protection of mice against *Pseudomonas aeruginosa* infection via induction of mucosal immunity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 99, n. 2, p. 667-680, 2015.

DABO, S. M. et al. Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. **Vaccine**, Holanda, v. 26, n. 34, p. 4345-4351, 2008.

DE JONG, W. H. D.; BORM, P. J. A. Drug Delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, Nova Zelândia, v. 3, n. 2, p. 133-149, 2008.

DENK, S.; PERL, M.; HUBER-LANG, M. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis? **European Surgical Research**, Suíça, v. 48, n. 4, p. 171-179, 2012.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, Reino Unido, v. 2, n. 8, p. 469-478, 2007.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, EUA, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

DÖRING, G.; MEISNER, C.; STERN, M. A double-blind randomized placebo-controlled

phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, EUA, v. 104, n. 26, p. 11020–11025, 2007.

DREIS, S. et al. Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 341, n. 1-2, p. 207-214, 2007.

DUNKLEY, M. L.; CLANCY, R. L.; CRIPPS, A. W. A role for CD4+ T cells from orally immunized rats in enhanced clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. **Immunology**, v. 83, n. 3, p. 362–369, 1994.

DUNKLEY, M. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa*-specific IgG1 and IgG2 subclasses in enhancement of pulmonary clearance following passive immunisation in the rat. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Alemanha, v. 39, n. 1, p. 37-44, 2003.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, Reino Unido, v. 41, n. 7, p. 2545-2561, 2012.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. **Chemical Society Reviews**, Reino Unido, v. 42, n. 12, p. 5552-5576, 2013.

ELSADEK, B.; KRATZ, F. Impact of albumin on drug delivery - new applications on the horizon. **Journal of Controlled Release**, Holanda, v. 157, n. 1, p. 428, 2012.

ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Holanda, v. 153, n. 3, p. 206–216, 2011.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Holanda, v. 157, n. 2, p. 168–182, 2012.

FLIGIEL, S. E. et al. Evidence for a role of hydroxyl radical in immune-complex-induced vasculitis. **The American Journal of Pathology**, EUA, v. 115, n. 3, p. 375-382, 1984.

FOGED, C. et al. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 298, n. 2, p. 315-322, 2005.

FOLKESSON, A. et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nature reviews**, Reino Unido, v. 10, n. 12, p. 841-851, 2012.

FURNO, F. et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: A new approach to prevention of infection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Reino Unido, v. 54, n. 6, p. 1019-1024, 2004.

GALES, A. C. et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates: Occurrence Rates, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Molecular Typing in the Global SENTRY

Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 1–10, 2001.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Holanda, v. 73, p. 354-360, 2012.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, Brasil, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GASELOWITZ, D.A.; NECKERS, L.M. Bovine serum albumin is a major oligonucleotide-binding protein found on the surface of cultured cells. **Antisense Research and Development**, v. 5, n. 3, p. 213-217, 1995.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, Reino Unido, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.

GIL-PEROTIN, S. et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. **Critical Care**, Reino Unido, 2012. Disponível em: <<http://ccforum.com/content/16/3/R93>>. Acesso em: 16 abril 2016.

GOMILA, M. et al. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 6, n. MAR, p. 1-13, 2015.

GOSSELIN, D. et al. Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Innate Resistance to Mouse Pulmonary Infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, EUA, v. 63, n. 9, 3272-3278, 1995.

GRASSMÉ, H. et al. CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. **Science**, EUA, v. 290, n. 5491, p. 527-530, 2000.

GRASSMÉ, H. et al. Regulation of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection by the transcriptional repressor Gfi1. **Cellular Microbiology**, Reino Unido, v. 8, n. 7, p. 1096-1105, 2006.

GRISHIN, A. V. et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. **Acta Naturae**, Russia, v. 7, n. 2, p. 29–41, 2015.

GUTIERRO, I. et al. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. **Vaccine**, Suíça, v. 21, n. 1-2, p. 67-77, 2002.

HAFNER, A. et al. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, Nova Zelândia, v. 9, p. 1005-1023, 2014.

HANCOCK, R. E. W. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other

Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, EUA, v. 27, p. 93–99, 1998.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, Reino Unido, v. 6, p. 319-327, 2002.

HARTL, D. et al. Pulmonary Th2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, EUA, v. 117, n. 1, p. 204-211, 2006.

HASHIMOTO, S. et al. Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to *Pseudomonas* airspace infections. **The American Journal of Physiology**, EUA, v. 270, p. 819-828, 1996.

HAUSER, A. R. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. **Nature Reviews Microbiology**, Reino Unido, v. 7, n. 9, p. 654–665, 2009.

HE, J. et al. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, EUA, v. 101, n. 8, p. 2530–2535, 2004.

HIDRON, A. I. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection control and hospital epidemiology**, EUA, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

HØIBY, N. Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in patients with bronchiectasis: helpful or harmful? **Thorax**, Reino Unido, v. 56, n. 9, p. 667–668, 2001.

HØIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. **Microbes and Infection**, Holanda, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2001.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiology**, Reino Unido, v. 5, n. 11, p. 1663-1674, 2010.

HØIBY, N.; FREDERIKSEN, B.; PRESSLER, T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Cystic Fibrosis**, Holanda v. 4, n. 2 SUPPL., p. 49–54, 2005.

HU, Y. J. et al. Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, Holanda, v. 39, n. 4-5, p. 280–285, 2006.

HUECK, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. **Microbiology and Molecular biology reviews**, EUA, v. 62, n. 2, p. 379–433, 1998.

IRACHE, J. M. et al. Albumin Nanoparticles for the Intravitreal Delivery of Anticytomegaloviral Drugs. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Emirados Árabes Unidos, v. 5, n. 3, p. 293-305, 2005.

ITOH, T. et al. Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. **The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, EUA, v. 293, n. 2, p. 446-452, 2007.

IVERSEN, T.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, Holanda, v. 6, n. 2, p. 176-185, 2011.

JAIN-VORA, S. et al. Interleukin-4 Enhances Pulmonary Clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, EUA, v. 66, n. 9, p. 4229-4236, 1998.

JOHANSEN, H. K. et al. Interferon-gamma (IFN- γ) treatment decreases the inflammatory response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats. **Clinical & Experimental Immunology**, Reino Unido, v. 103, p. 212-218, 1996.

JUNG, T. et al. Tetanus Toxoid Loaded Nanoparticles from Sulfobutylated Poly(Vinyl Alcohol)-Graft-Poly(Lactide-coGlycolide): Evaluation of Antibody Response After Oral and Nasal Application in Mice. **Pharmaceutical Research**, EUA, v. 18, n. 3, p. 352-360, 2001.

KANCHAN, V.; PANDA, A. K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. **Biomaterials**, Reino Unido, v. 28, n. 35, p. 5344-5357, 2007.

KAPLANSKI, G. et al. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in Immunology**, Holanda, v. 24, n. 1, p. 25-29, 2003.

KIFFER, C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **The Brazilian journal of infectious diseases**, Brasil, v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

KING, J. D. et al. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Innate immunity**, Reino Unido v. 15, n. 5, p. 261-312, 2009.

KOH, A. Y. et al. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infection and Immunity**, EUA, v. 77, n. 12, p. 5300-5310, 2009.

KONG, B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, Reino Unido, v. 6, n. 5, p. 929-941, 2011.

KOOGUCHI, K. et al. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infection and immunity**, EUA, v. 66, n. 7, p. 3164-3169, 1998.

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

KUHN, D. A. et al. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial

cells and macrophages. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, Alemanha, v. 5, n. 1, p. 1625-1636, 2014.

LANGER, K. et al. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 257, n. 1-2, p. 169-180, 2003.

LAVOIE, E. G.; WANGDI, T.; KAZMIERCZAK, B. I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Microbes and Infection**, Holanda, v. 13, n. 14-15, p. 1133–1145, 2011.

LI, Y. et al. X-ray irradiated vaccine confers protection against pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, Holanda, v. 6, p. 1-12, 2016.

LIU, J. et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 179–188, 2011.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, Holanda, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.

MAHAJAN-MIKLOS, S. et al. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa* - *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. **Cell**, EUA, v. 96, p. 47–56, 1999.

MAHAJAN-MIKLOS, S.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. **Molecular Microbiology**, Reino Unido, v. 37, n. 5, p. 981-988, 2000.

MAITRA, U. et al. IRAK-1 contributes to lipopolisaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, Coreia do Sul, v. 284, n. 51, p. 35403-35411, 2009.

MALLEY, Y. Q. O. et al. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, EUA, v. 285, n. 5, p. 1077–1086, 2003.

MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, EUA, v. 8, n. 5, p. 2216–2229, 2008.

MARRA, A. R. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, EUA, v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 2011.

MATHEE, K. et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, EUA, v. 105, n. 8, p. 3100–3105, 2008.

MCCORMICK, J. B. et al. Inactivated Lassa Virus elicits a non protective immune response

in Rhesus monkeys. **Journal of Medical Virology**, EUA, v. 37, n. 1, p. 1-7, 1992.

MELULENI, G. J. et al. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm *in vitro* are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. **The Journal of Immunology**, EUA, v. 155, p. 2029-2038, 1995.

MENON, D. et al. GSTO1-1 modulates metabolism in macrophages activated through the LPS and TLR4 pathway. **Journal of Cell Science**, Reino Unido, v. 128, n. 10, p. 1982-1990, 2015.

MERLOT, A. M.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein. **Frontiers in Physiology**, Suíça, v. 5, p. 1-7, 2014.

MERODIO, M. et al. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and *in vitro* release properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Suíça, v. 12, n. 3, p. 251-259, 2001.

MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, Reino Unido, v. 13, n. 6, p. 560-578, 2007.

MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. **PLoS ONE**, EUA, v. 6, n. 12, 2011.

MIZGERD, J. P. Acute lower respiratory tract infection. **The New England Journal of Medicine**, EUA, v. 358, n. 7, p. 716-727, 2008.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, EUA, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOSER, C. et al. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. **APMIS**, Reino Unido, v. 108, p. 329-335, 2000.

MÜLLER, B. G.; LEUENBERG, H.; KISSEL, T. Albumin Nanoespheres as Carriers for Passive Drug Targeting: An Optimized Manufacturing Technique. **Pharmaceutical Research**, EUA, v. 13, n. 1, p. 32-37, 1996.

MURTHY, S. K. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. **International Journal of Nanomedicine**, Nova Zelândia, v. 2, n. 2, p. 129-141, 2007.

NAZOUKI, A. et al. The common *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan M2 motif elicits non-protective antibodies. **Vaccine**, Holanda, v. 27, n. 27, p. 3513-3518, 2009.

- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química nova**, Brasil, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.
- NIKNEJAD, H.; MAHMOUDZADEH, R. Comparison of Different Crosslinking Methods for Preparation of Docetaxel-loaded Albumin Nanoparticles. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Irã, v. 14, n. 2, p. 385-394, 2015.
- O'HAGAN, D. T.; RAPPUOLI, R. Novel Approaches to Vaccine Delivery. **Pharmaceutical Research**, EUA, v. 21, n. 9, p. 1519-1530, 2004.
- O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Reviews Drug Discovery**, Reino Unido, v. 2, n. 9, p. 727-735, 2003.
- OUSSOREN, C.; STORM, G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Holanda v. 50, n. 1-2, p. 143-156, 2001.
- OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; CUI, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert Reviews Vaccines**, Reino Unido, v. 9, n. 9, p. 1095-1107, 2010.
- PANTIC, I. Nanoparticles and modulation of immune responses. **Science Progress**, Reino Unido, v. 94, n. 1, p. 97-107, 2011.
- PÈNE, F. et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. **The Journal of Immunology**, EUA, v. 181, n. 12, p. 8513-8520, 2008.
- PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. Brasil: Guanabara Koogan, 2013. cap. 4, p. 65-116.
- PITAKSUTTEPONG, T. Nanoparticles : A Vaccine Adjuvant for Subcutaneous Administration. **Naresuan University Journal**, Tailândia, v. 13, n. 2, p. 53-62, 2005.
- PITT, T. L.; SIMPSON, A. J. H. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In: GILLESPIE, S. (Ed); HAWKEY, P. M. (Ed). **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**. England: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. cap. 36, p. 427-443.
- POLLACK, M. The Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Reviews of infectious diseases**, v. 6, n. 3, p. 617-626, 1984.
- POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. New York: Churchill Livigstone, 2000, p. 2310-2335.
- POTTINGER, P.; RELLER, L. B.; RYAN, K. J. *Pseudomonas* and Other Opportunistic Gram-negative Bacilli. In: RYAN, K. J. et al. **Sherris Medical Microbiology**. USA: McGraw-Hill Education/ Medical, 2014. cap. 35, p. 617-626.

POWDERLY, W. G.; PIER, G. B.; MARKHAM, R. B. T lymphocyte-mediated protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in granulocytopenic mice. **Journal of Clinical Investigation**, EUA, v. 78, n. 2, p. 375–380, 1986.

PRICE, B. M. et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Lung Infection in Mice by Genetic Immunization against Outer Membrane Protein F. **Infection and Immunity**, EUA, v. 69, n. 5, p. 3510-3515, 2001.

PRIEBE, G. P. et al. Construction and characterization of a live, attenuated aroA deletion mutant of *Pseudomonas aeruginosa* as a candidate intranasal vaccine. **Infection and Immunity**, EUA, v. 70, n. 3, p. 1507–1517, 2002.

QI, J. et al. Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core-Doxorubicin loading and delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 393, n. 1-2, p. 176-184, 2010.

RAHIMNEJAD, M.; JAHANSHAHI, M.; NAJAFPOUR, G. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 5, n. 20, p. 1918-1923, 2006.

RAHIMNEJAD, M.; MOKHTARIAN, N.; GHASEMI, M. Production of protein nanoparticles for food and drug delivery system. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 8, n. 19, p. 4738-4743, 2009.

RAHME, L. G. et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science**, EUA, v. 268, n. 5219, p. 1899–902, 1995.

RAOUST, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or Flagellin Are Sufficient to Activate TLR-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells. **PLoS ONE**, 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/metrics?id=10.1371%2Fjournal.pone.0007259>>. Acesso em: 19 abril 2016.

RAU, M. H. et al. Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. **Environmental Microbiology**, Reino Unido, v. 12, n. 6, p. 1643–1658, 2010.

REDDY, S. T. et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 25, n. 10, p. 1159-1164, 2007.

REINO UNIDO. European Medicines Agency. **Nanotechnology**. 2017. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9>. Acesso em: 17 agosto 2017.

RICE-FICHT, A. C. et al. Polymeric particles in vaccine delivery. **Current Opinion in Microbiology**, Holanda, v. 13, n. 1, p. 106-112, 2010.

- RODRIGUES, N. F. et al. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Vaccine**, Holanda, v. 31, n. 44, p. 5062-5066, 2013.
- ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 489p.
- ROSOK, M. J. et al. Generation and Characterization of Murine Antiflagellum Monoclonal-Antibodies That Are Protective against Lethal Challenge with *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, EUA, v. 58, n. 12, p. 3819–3828, 1990.
- ROY, K. et al. Oral gene delivery with chitosan–DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. **Nature Medicine**, Reino Unido, v. 5, n. 4, p. 387-391, 1999.
- SADER, H. S. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Holanda, v. 43, n. 4, p. 328–334, 2014.
- SADIKOT, R. T. et al. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, EUA, v. 171, n. 11, p. 1209–1223, 2005.
- SAFDAR, N.; CRNICH, C. J.; MAKI, D. G. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. **Respiratory care**, EUA, v. 50, n. 6, p. 725–39, 2005.
- SATO, H. et al. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa* -encoded type III cytotoxin , ExoU. **The EMBO journal**, Inglaterra, v. 22, n. 12, p. 2959–2969, 2003.
- SAWA, T. et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. **Nature medicine**, Reino Unido, v. 5, n. 4, p. 392–398, 1999.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Brasil, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutics targets-an updated view. **Mediators of Inflammation**, Egito, v. 2013, p. 1-16, 2013.
- SHARMA, A; KRAUSE, A; WORGALL, S. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. **Human Vaccines**, EUA, v. 7, n. 10, p. 999–1011, 2011.
- SILBY, M. W. et al. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. **FEMS Microbiology Reviews**, Reino Unido, v. 35, n. 4, p. 652–680, 2011.
- SILVA, E. F. et al. A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice.

Journal of nanobiotechnology, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439913>\n<http://www.jnanobiotechnology.com/content/pdf/1477-3155-10-13.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2016.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advances in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 17, n. 11, p. 1075-1081, 1999.

SKERRETT, S. J. et al. Role of the type TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. **The American Journal of physiology**, EUA, v. 276, n. 5, p. 715-727, 1999.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, Holanda, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUSA, A. M.; PEREIRA, M. O. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 680-703, 2014.

STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, Reino Unido, v. 406, n. 6799, p. 959-964, 2000.

SUFFREDINI, G.; EAST, J. E.; LEVY, L.M. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging. **American Journal of Neuroradiology**, EUA, v. 35, n. 7, p. 1246-1253, 2014.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, EUA, v. 453, n. 2, p. 254-267, 2014.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, Reino Unido, v. 11, n. 1, p. 14104, 2010.

TANG, H.; KAYS, M.; PRINCE, A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. **Infection and Immunity**, EUA, v. 63, n. 4, p. 1278-1285, 1995.

TANTRA, R.; TOMPKINS, J.; QUINCEY, P. Characterisation of the de-agglomeration effects of bovine serum albumin on nanoparticles in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Holanda, v. 75, n. 1, p. 275-281, 2010.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, EUA, v. 34, n. 5, p. 3-10, 2006.

TISONCIK, J. R. et al. Into de the eye of the cytokine storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, EUA, v. 76, n. 1, p. 16-32, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VOGEL, F. R. Immunologic Adjuvants for Modern Vaccine Formulations. **Annals of the New York Academy of Science**, EUA, v. 31, n. 754, p. 153-160, 1995.

WARD, P. A.; FATTAHI, F.; BOSMANN, M. New insights into molecular mechanisms of immune complex-induced injury in lung. **Frontiers in Immunology**, Suíça, v. 7, n. 86, p. 1-7, 2016.

WEBER, C. et al. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 194, n. 1, p. 91-102, 2000.

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

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. **Respirology**, Reino Unido, v. 15, n. 7, p. 1037–1056, 2010.

WILLIAMS, I. R.; PARKOS, C. A. Colonic Neutrophils in Inflammatory Bowel Disease: Double-Edged Swords of the Innate Immune System With Protective and Destructive Capacity. **Gastroenterology**, Reino Unido, v. 133, n. 6, p. 2049-2052, 2007.

WONNENBERG, B. et al. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. **Innate Immunity**, Reino Unido, v. 22, n. 8, p. 620-625, 2016.

YAMEEN, B. et al. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. **Journal of Controlled Release**, Holanda, v. 190, p. 485-499, 2014.

YOUNGER, J. G. et al. Murine complement interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and their consequences during pneumonia. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, EUA, v. 29, n. 4, p. 432-438, 2003.

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

ANEXOS

ANEXO A – Carga bacteriana nos pulmões (UFC/mg de tecido) de animais imunizados e infectados com a *P. aeruginosa* PA14.

Grupos				
	NPV	NPPa	PBS	PPa
Animal 1	$9,33 \times 10^5$	$1,51 \times 10^4$	$1,02 \times 10^7$	$3,01 \times 10^5$
Animal 2	9,98	0	$2,07 \times 10^2$	$7,67 \times 10^4$
Animal 3	13,4	0	$5,35 \times 10^4$	$1,11 \times 10^4$
Animal 4	$7,83 \times 10^5$	$1,53 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$1,18 \times 10^5$
Animal 5	$1,02 \times 10^5$	0	$1,6 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$
Animal 6	0	0		
Animal 7	$8,74 \times 10^3$	$4,65 \times 10^2$		
Animal 8	$3,07 \times 10^5$	$1,74 \times 10^5$		
Animal 9	0	0		
Animal 10	$2,77 \times 10^6$			

Fonte: Da autora

ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIFAL) – 2015.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 645/2015, sob responsabilidade de Luiz Felipe Leomil Coelho, referente ao projeto "Avaliação da eficiência da vacinação com nanopartículas de albumina sérica bovina em modelo murino de infecção com a cepa virulenta de *Pseudomonas aeruginosa*", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL) em 16 de julho de 2015.

Alfenas, 16 de julho de 2015.

Estela Regina de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL