

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**WILLIAM PERMAGNANI GOZZI**

**AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA  
BOVINA MIMÉTICA A PATÓGENO PELA VIA NASAL EM MODELO DE  
INFECÇÃO PULMONAR CAUSADO POR *Pseudomonas aeruginosa***

**Alfenas/MG**

**2024**

**WILLIAM PERMAGNANI GOZZI**

**AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA MIMÉTICA A PATÓGENO PELA VIA NASAL EM MODELO DE INFECÇÃO PULMONAR CAUSADO POR *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

**Alfenas/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Gozzi, William Permagnani.

Avaliação da imunização com nanopartículas de albumina sérica bovina mimética a patógeno pela via nasal em modelo de infecção pulmonar causado por *Pseudomonas aeruginosa* / William Permagnani Gozzi. - Alfenas, MG, 2024.

86 f. : il. -

Orientador(a): Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. *P. aeruginosa*. 2. Nanotecnologia. 3. Albumina Sérica Bovina. 4. Adjuvante. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil, orient. II. Título.

## WILLIAM PERMAGNANI GOZZI

### AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA MIMÉTICA A PATÓGENO PELA VIA NASAL EM MODELO DE INFECÇÃO PULMONAR CAUSADO POR *Pseudomonas aeruginosa*

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da 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.

Aprovada em: 6 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Cyntia Silva Ferreira

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz Castro

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 06/08/2024, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1306802** e o código CRC **C4B631F4**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Elaine e João pelo apoio e oportunidades que me deram até este momento.

Agradeço a UNIFAL-MG como instituição por toda a vivência, conhecimento, oportunidades e incentivos, tal como infraestrutura e funcionários que zelam pela mesma.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Vacinas pelos bons momentos e por todo apoio. Em especial agradeço meu orientador Luiz Felipe pela confiança e oportunidade além de paciência e compreensão ao longo deste processo; as minhas amigas Raíne e Ana por compartilharem suas experiências e contribuírem com meus experimentos e a professora Carine por sua contribuição e ensinamentos.

Agradeço a todos meus amigos e namorada que estiveram comigo nesse período pelo apoio e por tornar este processo mais agradável, em especial os arraianos: Guilherme, Bianca, Sergio, Taís, Igor, Mylena, Bruna e Luana

Agradeço e respeito todas as vidas animais que tiveram um propósito neste trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pelo incentivo e fomento à pesquisa, tornando este e muitos outros trabalhos viáveis.

## RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais bactérias responsáveis por infecções nosocomiais, apresentando grande resistência a antibióticos e relacionada a diversos casos de óbitos, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Atualmente não existem vacinas para *P. aeruginosa* e a busca por novos tratamentos vem se tornando uma prioridade. O uso de nanopartículas (NPs) como sistemas de entrega de antígenos demonstra ser eficiente em diversas situações podendo levar a um maior estímulo do sistema imunológico. Logo, devido à preocupação global com as infecções por *P. aeruginosa*, o respectivo trabalho tem por principal objetivo verificar a eficiência da imunização nasal por NPs de albumina sérica bovina contendo poliinosínico-policitidílico (poli I:C) (NPPI) e nanopartículas vazias (NPV) em modelo *in vivo* murino. As NPs sintetizadas foram caracterizadas, apresentando um diâmetro médio de 261 nm (NPV) e 497 nm (NPPI) e potencial zeta próximo de -30mV. As NPs foram utilizadas para imunização de camundongos fêmeas C57BL/pela via intranasal presença ou não de proteínas totais de *P. aeruginosa*. A produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* pré infecção foi avaliada por meio de ELISA nos animais imunizados. Após a imunização, os animais foram desafiados com *P. aeruginosa* e tiveram seus pesos e taxa de sobrevivência acompanhados. Após a morte/eutanásia dos animais, seus pulmões foram retirados e utilizados para quantificação de carga bacteriana em UFC/mL e análise histopatológica. Nossos resultados apontam uma produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* circulantes no sangue e nos pulmões dos animais. Entretanto a perda de peso dos animais após a infecção e a quantificação de carga bacteriana indicam que os anticorpos não foram protetivos. A histopatologia do pulmão reforçou a ineficácia dos tratamentos em combater a infecção. Portanto, nossos resultados sugerem que a via de administração intranasal não é uma boa rota para induzir imunidade contra *P. aeruginosa* utilizando nanopartículas miméticas a patógenos.

Palavras chave: *P. aeruginosa*; nanotecnologia; albumina sérica bovina; adjuvante

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacterium that is found in soil and water and also could be present in hospital environments and equipment, making it a potential agent of infections, especially in immunocompromised patients. This pathogen is a major cause of hospitalar infections and exhibits significant resistance to antibiotics. The World Health Organization classified this bacterium as one of the microorganisms of greatest global concern. The use of nanoparticles (NPs) as antigen delivery systems has proven to be efficient, potentially leading to a greater stimulation of the immune system. Therefore, due to the global concern about *P. aeruginosa* infections, the main objective of this study is to assess the efficiency of nasal immunization with bovine serum albumin containing poliinosínico-policitidílico (poli I:C) (NPPI) and empty nanoparticles (NPV) *in vivo* model. The NPs synthesized were characterized showing an average diameter of 26 nm (NPV) e 497 nm (NPPI) and Zeta potential close to -30mV. The NPs were used to immunize C57BL/6 female mice via intranasal route with or without total *P. aeruginosa* proteins. The production of anti-*P.aeruginosa* IgG antibodies pre-infection was assessed using ELISA. After immunization, the animals were challenged with *P. aeruginosa* and their weight and survivor rate were monitored. After the death/euthanasia of the animals, their lungs were removed and used to quantify the bacterial load in CFU/mL and histopathological analysis. Our results show the production of anti *P. aeruginosa* IgG antibodies circulating in the blood and lungs of the animals however the weight lost of animals after infection and the bacterial load indicate that the antibodies are not protective. The lung histopathology reinforced the inefficiency of treatments in combating the infection. Therefore our results suggest that the intranasal administration route is not suitable for induce immunity against *P. aeruginosa* using mimetic nanoparticles.

Keywords: *P. aeruginosa*; nanotechnology; bovine seric albumin; adjuvant

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 2 - Esquema representativo de fatores de virulência evidenciados em <i>P. aeruginosa</i> .....	20
Figura 3 - Fatores de resistência em <i>P. aeruginosa</i> .....	26
Figura 4 - Classificação e exemplificação de tipos de nanopartículas.....	33
Figura 5 - Síntese de nanopartículas pelo método de coacervação.....	39
Figura 6 - Delineamento experimental da imunização animal. ....	46
Figura 7 - Caracterização morfológica das nanopartículas de BSA do tipo NPPI e NPV em microscopia eletrônica de varredura. ....	52
Figura 8 - Teste de adesão de proteínas de <i>P. aeruginosa</i> em superfície de nanopartículas.....	53
Figura 9 - Produção de anticorpos IgG anti- <i>P. aeruginosa</i> em grupos de animais tratados com 3 doses de imunizantes via nasal com as diferentes formulações.....	54
Figura 10 - Titulação dos anticorpos IgG anti <i>P. aeruginosa</i> encontrados em soros de animais tratados com 3 doses de imunizantes via nasal com as diferentes formulações.....	55
Figura 11 - Aumento, em porcentagem, do ganho de pesos dos animais imunizados e não imunizados ao longo dos dias. ....	56
Figura 12 - Curva de sobrevivência dos animais desafiados com <i>P. aeruginosa</i> . ....	57
Figura 13 - Variação em porcentagem nos pesos dos animais desafiados com <i>P. aeruginosa</i> ao longo de 2 dias. ....	58
Figura 14 - Unidades Formadoras de Colônia/mg (UFC) em tecido pulmonar de animais desafiados por <i>P. aeruginosa</i> .....	59
Figura 15 - Quantificação de anticorpos IgG em macerado pulmonar de animais desafiados com <i>P. aeruginosa</i> .....	60
Figura 16 - Análise histopatológica dos pulmões. ....	61
Tabela 1 – Diâmetro médio, potencial Zeta e índice de polidispersão das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) contendo ácido polinosínico-polícridílico (poli I:C) e NP vazias (NPV).....	51

## LISTA DE SIGLAS

µL	Microlitros
ANOVA	Análise de Variância
AS	Albumina sérica
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus Celsius
cAMP	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
cCMP	Citidina 3',5'-Monofosfato Cíclico
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cGMP	Dibutiril Guanosina-3',5' Monofosfato
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETA	Exotoxina A
ExoS	Exoenzima S
ExoT	Exoenzima T
ExoU	Exoenzima U
ExoY	Exoenzima Y
FC	Fibrose cística
FDA	<i>Food and drug administration</i>
g	Força g
GAP	Proteína ativadora de GTP-ase
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HSA	Albumina sérica humana
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IP	Intraperitonal
ISSO	Organização internacional para padronizações
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
mg	Miligrama

mL	Mililitros
nm	Nanômetro
NP	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PAP-1	Ilha de patogenicidade 1
PAP-2	Ilha de patogenicidade 2
PBS	Tampão fosfato salina
PDR	Pan-Resistentes a Drogas
PEM	Epítomos de proteínas miméticas
PRR	Padrões de reconhecimento de receptores
Poli I:C	Acido polininosínico:policitidílico
RDT	Resistência Difícil de Tratar
RNA	Ácido ribonucleico
AS	Albumina sérica
Th	Célula T auxiliar
TLR	Tool-like receptor
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
T $\gamma\delta$	Células T gama-delta
T3SS	Sistema de secreção tipo 3
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultra violeta
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
UTI	Unidade de tratamento intensivo
XDR	Extensivamente Resistente a Drogas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
2.1.1	<b>Fatores de virulência</b> .....	15
2.1.2	<b>Infecções por <i>P. aeruginosa</i></b> .....	20
2.1.3	<b>Resistência antimicrobiana</b> .....	23
2.1.4	<b>Resposta imunológica contra <i>P. aeruginosa</i></b> .....	26
2.1.5	<b>Tratamentos e imunoprofilaxia</b> .....	29
2.2	<b>NANOPARTÍCULAS</b> .....	31
2.2.1	<b>Nanopartículas e resposta imunológica</b> .....	34
2.2.2	<b>Nanopartículas de albumina sérica bovina</b> .....	37
2.3	<b>ÁCIDO POLININOSÍNICO:POLICITILDÍLICO (POLI I:C)</b> .....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	<b>OBJETIVOS GERAL</b> .....	42
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
4.1	<b>SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS VAZIAS E NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO POLINOSÍNICO:POLICITIDÍLICO (POLI I:C)</b> .....	43
4.2	<b>CRESCIMENTO DE <i>P. AERUGINOSA</i> E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS</b> .....	44
4.3	<b>VERIFICAÇÃO DE EFEITO CORONA NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS</b> .....	44
4.4	<b>ENSAIO DE IMUNIZAÇÃO ANIMAL</b> .....	45
4.5	<b>DESAFIO DOS ANIMAIS COM CEPA 14 DE <i>P. AERUGINOSA</i></b> .....	47

4.6	ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>P. AERUGINOSA</i> ....	47
4.7	TITULAÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI PROTEÍNAS TOTAIS DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	48
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA NOS PULMÕES DE ANIMAIS INFECTADOS POR <i>P. AERUGINOSA</i> .....	49
4.9	QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IGG EM TECIDOS PULMONARES DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>P. AERUGINOSA</i> .....	49
4.10	HISTOPATOLOGIA.....	49
4.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudomonas* foi descrito, inicialmente, no ano de 1894 por Migula utilizando-se como critérios a motilidade e as dimensões celulares, uma referência aos flagelados do gênero *Monas* (Boyce, 1995; Palleroni, 2010). Posteriormente, com os avanços nas áreas de biologia molecular e genética, novas formas de classificação foram utilizadas para a descrição dos organismos. Este gênero de bactérias possui mais de 140 espécies ubiqüitárias e saprófitas associadas, em muitos casos, com infecções de animais e plantas (Tayeb *et al.*, 2005; Gomila *et al.*, 2015). A *Pseudomonas aeruginosa*, (PA), por sua vez, é uma espécie bastante presente em âmbito hospitalar, correspondendo a uma das principais responsáveis por infecções nosocomiais (Moradali; Ghods; Rehm, 2017; Obritsch *et al.*, 2005). Essa bactéria é capaz de se proliferar em diversos tipos de tecidos como pele acometida por graus severos de queimaduras, trato respiratório, urinário, entre outros (Blomquist; Nix, 2021).

Atualmente, a *P. aeruginosa* é um problema de saúde global devido ao surgimento de cepas mais virulentas que expressam diversos mecanismos de defesa e escape do sistema imune o que afeta, principalmente, pacientes imunocomprometidos (Miyoshi-akiyama *et al.*, 2017; Thi; Wibowo; Rehm, 2020). Além disso, a *P. aeruginosa* possui cepas com diferentes níveis de resistência a antibióticos, tornando-a mais difícil de ser tratada (Chandler *et al.*, 2019). A Organização das Nações Unidas (ONU) criou o acrônimo ESKAPE em referência às bactérias de maior relevância sendo a *P. aeruginosa* classificada como alvo de necessidade máxima para a busca de novos tratamentos (Who, 2017 ).

A indústria farmacêutica busca a formulação de novas drogas para o tratamento das infecções pela *P. aeruginosa*, alguns antibióticos como o POL7001 são promissores para a eliminação do micro-organismo (Chatterjee *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2019). Por outro lado, as soluções biotecnológicas visam outras alternativas para o combate do patógeno. As vacinas são uma abordagem que tem, por objetivo, treinar as células do sistema imune no organismo para reconhecer e combater o patógeno em caso de infecção. Todavia, ainda não há vacinas para *P. aeruginosa*, o que traz um desafio a mais para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas (Priebe; Diseases; Goldberg, 2015).

As nanopartículas (NPs) são estruturas particuladas com dimensões entre 10 a 100 nm (Joudeh; Linke, 2022) que vem sendo exploradas como plataformas vacinais devido as suas propriedades de liberação controlada e efeito adjuvante no sistema de entrega de antígenos (O'hagan; Rappuoli, 2004; Peek; Middaugh; Berkland, 2008; Akagi; Baba; Akashi, 2011). As (NPs) podem apresentar diferentes estruturas e composições químicas sendo que no grupo das orgânicas incluem-se as constituídas por proteínas (Venturini, 2019). A albumina é uma proteína sérica muito abundante e que desempenha importantes funções nos mamíferos (Kajal; Pathania, 2021; Merlot; Kalinowski; Richardson, 2014). Além disso, devido as suas propriedades físico-químicas, a albumina é boa candidata à sistema de entrega com ou sem associação de outras moléculas (Bujacz, 2012; Elzoghby; Samy; Elgindy, 2012). O ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C) é uma estrutura sintética análoga a um RNA de dupla fita, um tipo de padrão molecular associado a patógeno (PAMP) viral (Hafner; Corthésy; Merkle, 2013). Com isso, o poli I:C é utilizado também como um sensibilizante do sistema imune apresentando uma importante ação adjuvante (Andresen; Gjøen, 2021; Ichinohe *et al.*, 2005; Ribes *et al.*, 2020).

Portanto, mediante a necessidade de se buscar novas alternativas para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* o respectivo trabalho tem por objetivo central avaliar a capacidade de NPs de BSA em associação com o poli I:C como um adjuvante vacinal em modelo de imunização nasal *in vivo* murino desafiado com uma cepa virulenta de *P. aeruginosa*.

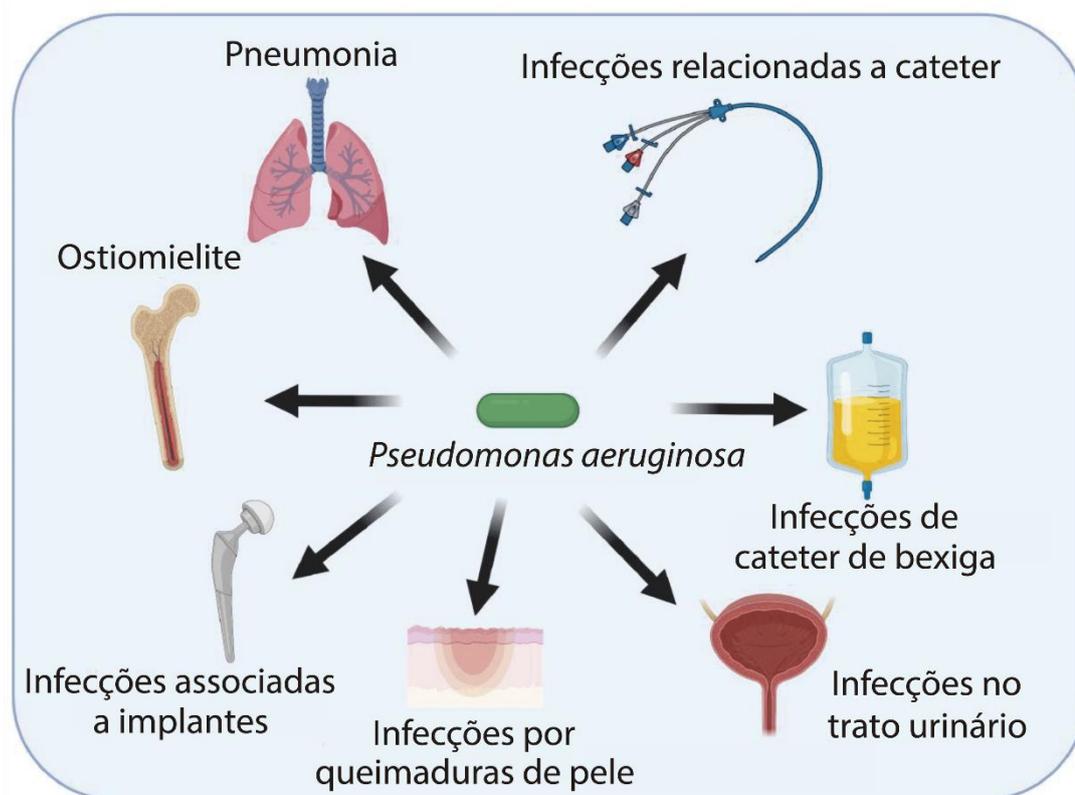
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* foi descrito, inicialmente, por Migula (Migula, 1894) que, apesar de ser botânico, contribuiu com a bacteriologia com seus trabalhos em taxonomia (Peix; Bahena; Velázquez, 2009). Inicialmente, acreditava-se que o nome do gênero cunhado pelo cientista era proveniente da junção dos termos *pseudo* (falso) mais *monas* (unidade), contudo a intenção de Migula era estabelecer um comparativo de tamanho e motilidade e entre as bactérias e os flagelados do gênero *Monas*, portanto, “falsas monas” (Palleroni, 2010). Este grupo é composto por uma grande variedade de bactérias saprófitas gram-negativas de vida livre com forma de bastonete e geralmente dispostas em pares (Murray, 2017). Estas bactérias são ubíquitas, presentes em diversos tipos de ambiente como solos, água e podem estar tanto em associação com plantas e animais quanto com agentes infecciosos (Palleroni, 1981; Murray, 2017). Essas bactérias também são comuns em diversas superfícies, como embalagens de alimentos, torneiras, equipamentos médicos entre outras, podendo ser capazes de aderir a uma superfície por meio de biofilmes, o que pode ser um agravante devido a resistência a processos de desinfecção e microbicidas (Neves *et al.*, 2014).

Inicialmente, quando proposto por Migula, a descrição do gênero se dava por meio de morfologia das células, o que se tornou obsoleto à medida que novas espécies eram descritas. Atualmente, são conhecidas mais de 140 espécies de bactérias no gênero *Pseudomonas* que podem ser classificadas a partir de diversas técnicas moleculares (Tayeb *et al.*, 2005; Gomila *et al.*, 2015). Entre as espécies de maior relevância para a saúde humana, destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa* (PA), uma das principais bactérias responsáveis por infecções nosocomiais (Moradali; Ghods; Rehm, 2017; Obritsch *et al.*, 2005). Estima-se que a *P. aeruginosa* seja responsável por 11% a 14% aproximadamente de todas as infecções nosocomiais incluindo pneumonias, infecções no trato urinário, no sangue e na pele decorrente de queimaduras graves (Blomquist; Nix, 2021). Além de comuns as infecções associadas a essa bactéria, seus índices de morbidade e mortalidade são grandes em relação a de outras bactérias patogênicas (Driscoll; Brody; Kollef, 2007). Na Figura 1 representa-se as principais infecções causadas por *P. aeruginosa*.

Figura 1 - Infecções causadas por *P. aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de Tuon *et al.* (2022).

Ao todo, são descritas mais de 5000 cepas de *P. aeruginosa*, mas em nível laboratorial estudam-se, com maior frequência, as cepas PA01 e PA14, que são fundamentais para a descrição de novos alvos terapêuticos, tratamentos e compreensão da biologia da bactéria (Grace *et al.*, 2022). A cepa PA01 provém de um isolado de ferida e foi obtida no laboratório de Bruce Holloway em Melbourne, Austrália, 1954 (Holloway, 1955). Contudo, as cepas utilizadas atualmente consistem em novas linhagens que passaram por várias mutações, adquirindo alterações fenotípicas e genotípicas, como por exemplo resistência a cloranfenicol (Chandler *et al.*, 2019). Por outro lado, a cepa PA14 é um patógeno virulento para plantas e animais, isolado a partir de queimaduras de pacientes do hospital da Pennsylvania. A partir deste momento, a bactéria tornou-se parte da coleção da “University of California Berkeley Plant Pathology” de onde surgiu o código UCBPP-PA14 (Mathee, 2018).

O primeiro sequenciamento de *P. aeruginosa* foi realizado na cepa PA01 sendo verificado a presença de 6,3 milhões de pares de bases e 5700 genes (Stover *et al.*, 2000). Tal material genético é organizado, majoritariamente, em um cromossomo circular único e principal, podendo haver também DNAs acessórios em plasmídeos e

blocos de material genético inseridos em diferentes *locus* do cromossomo principal (Klockgether *et al.*, 2011). A cepa PA14, por sua vez, possui um genoma ligeiramente maior, contendo 6,5 milhões pares de bases (Lee *et al.*, 2006). De modo geral, as diferentes cepas de *P. aeruginosa* possuem 321 genes essenciais, responsáveis pela produção de enzimas citosólicas associadas a: metabolismo (41%); proteínas associadas aos eventos de transcrição, tradução e replicação (37%); proteínas envolvidas na construção e divisão de membranas e outras estruturas (4%) proteínas associadas ao metabolismo de membranas (3,7%); proteínas de membrana com função de transportadores e chaperonas (8%) entre outras (Poulsen *et al.*, 2019). Contudo, as diversas cepas acumulam diferenças em seus genomas e por meio de técnicas de análise de DNA por sondas (Ernst *et al.*, 2003) e hibridização (Wolfgang *et al.*, 2003), verificam-se variações entre 89% e 98% em relação a PA01. Acredita-se que as cepas de *P. aeruginosa* possuam essas diferenças por conta da aquisição e recombinação de genes por transferência horizontal, o que pode levar a um aumento da virulência da bactéria (Lee *et al.*, 2006). Estima-se que os genes acessórios em cepas mais virulentas de *P. aeruginosa* correspondam entre 6,9% a 18% do genoma bacteriano, que incluem genes associados a mobilidade do micro-organismo, resistência a antibióticos, formação de biofilmes e afins (Ozer; Allen; Hauser, 2014; Poulsen *et al.*, 2019).

As cepas mais virulentas também podem levar a agravamentos severos em pacientes imunocomprometidos como portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e acometidos por câncer, além de ser um dos principais responsáveis por óbitos associados a fibrose cística (FC), uma vez que a bactéria é oportunista (Akiyama *et al.*, 2017; Thi; Wibowo; Rehm, 2020). No ano de 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um relatório apontando a necessidade de se buscar novas drogas e tratamentos para diversas infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos (Who, 2017 ). Assim, foi criado o acrônimo “ESKAPE”, fazendo referência a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter spp*, e a *P. aeruginosa* foi classificada como máxima prioridade entre três categorias: prioridade crítica, alta e média (Oliveira *et al.*, 2020).

Na questão de potencial de virulência e patogenia, a cepa PA14 é fortemente modulada pelas “ilhas de patogenicidade”, que são genes associados a maior expressão de fatores de virulência, adquiridos por transferência horizontal de genes

(Lee *et al.*, 2006). Duas grandes ilhas de patogenicidades conhecidas são nomeadas como PAPI-1 e PAP-2. A PAP-1 é um conjunto de 108 genes com 108 kb que carrega vários genes reguladores como o *pvrR*, associado com a produção de biofilmes e a resistência bacteriana a antibióticos e os genes responsáveis pela síntese de pili IVt tipo B, que são associados a pacientes com FC (Harrison *et al.*, 2010; Qiu; Gurkar; Lory, 2006). No grupo de genes de PAPI-1 também são expressos RNAs não codificantes que contribuem com a expressão da piocina (Ferrara *et al.*, 2017). A PAPI-2, por sua vez, possui 11 kb, sendo possivelmente remanescente de uma outra ilha maior. Dentro de PAPI-2 encontra-se a citotoxina ExoU, uma importante proteína do tipo Sistema de Secreção Tipo 3 (T3SS), que são sistemas de secreção bacteriana. Estudos mostram que a ExoU tem grande parcela em infecções agudas de pulmão e presente em infecções crônicas, sepses, infecções por queimaduras, na corrente sanguínea, na pele entre outras (Harrison *et al.*, 2010; Sawa *et al.*, 2016).

### 2.1.1 Fatores de virulência

A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista que apresenta uma série de fatores que a tornam virulenta, desde aspectos estruturais da célula à síntese de proteínas e toxinas que vão interagir com o hospedeiro (Liao *et al.*, 2022; Pang *et al.*, 2019). Estruturalmente, a bactéria apresenta proteínas de superfície, pili e um flagelo locomotor que favorecem a locomoção, fixação e penetração do micro organismo no tecido (Fong; Yildiz, 2015). O lipopolisacarídeo (LPS) é uma estrutura externa de célula que também atua como uma barreira, dificultando a ação de antibióticos e respostas celulares do hospedeiro até o patógeno. Somado a isso, o lipídio A do LPS bacteriano pode promover danos celulares ao hospedeiro a fim de facilitar a interação com os receptores da célula (Qin *et al.*, 2022).

Quanto à síntese proteica, diversas moléculas produzidas pela bactéria aumentam sua virulência, como é o caso da exotoxina A (ETA), que é um produto tóxico secretado por cerca de 80 a 90% dos isolados de *P. aeruginosa* (Zanjani *et al.*, 2019). Tal enzima possui 638 aminoácidos e 2 subunidades, sendo o domínio A responsável pela atividade enzimática e o B pela ligação com a célula (Michalska; Wolf, 2015) interrompendo a elongação da cadeia de peptídeos e, conseqüentemente, levando à interferência na síntese proteica de células eucarióticas (Mcewan; Kirienko; Ausubel, 2012). Dentre os produtos bacterianos, há quatro de Exo-enzimas (Exo) secretadas

pelo T3SS: ExoU, ExoS, ExoT e ExoY (Liao *et al.*, 2022). As Exo S e Exo T compartilham 76% de sequência de similaridade e são enzimas bifuncionais que catalisam a atividade da proteína ativadora de GTP-ase (GAP) e da ADP-ribosiltransferase. Essas reações podem danificar o citoesqueleto celular fazendo com que a célula perca adesão com as demais iniciando um processo de apoptose (Liao *et al.*, 2022; Shaver *et al.*, 2004). A ExoU é descrita como um tipo de fosfolipase, altamente virulenta, capaz de causar necrose e morte celular (Sato *et al.*, 2003, 2005). A ExoY, por sua vez, é classificada como uma adenilato ou nucleotidil ciclase que aumenta os níveis intracelulares de cAMP, cGMP, cUMP e cCMP. Estudos mais recentes apontam que a exo-enzima também exerce uma função de ciclase capaz de induzir a formação de monofosfatos de nucleotídeos cíclicos de purina e pirimidina. Essas reações promovidas pela ExoY podem levar a um arredondamento celular por conta da ruptura dos microtúbulos o que reduz a integridade do tecido e leva a edema (Kloth *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2022; Morrow *et al.*, 2018).

A piocianina, por sua vez, é um pigmento de coloração azulada e fluorescente de grande relevância, sendo sintetizado por mais de 90% das cepas de *P. aeruginosa* (Saleem *et al.*, 2021). Possui relação com a absorção de ferro em condição de baixa concentração de oxigênio e possui ação de controle na expressão de genes responsáveis pela síntese de bombas de efluxo de metais, como a prata (Abdelaziz *et al.*, 2023). Além disso, este pigmento possui fácil absorção pelos tecidos, ocasiona lesão tecidual e pode ser encontrado no escarro de pacientes acometidos pela infecção. A substância pode causar danos às células como inibição da respiração e do crescimento celular e aumento da citotoxicidade (Lau *et al.*, 2004).

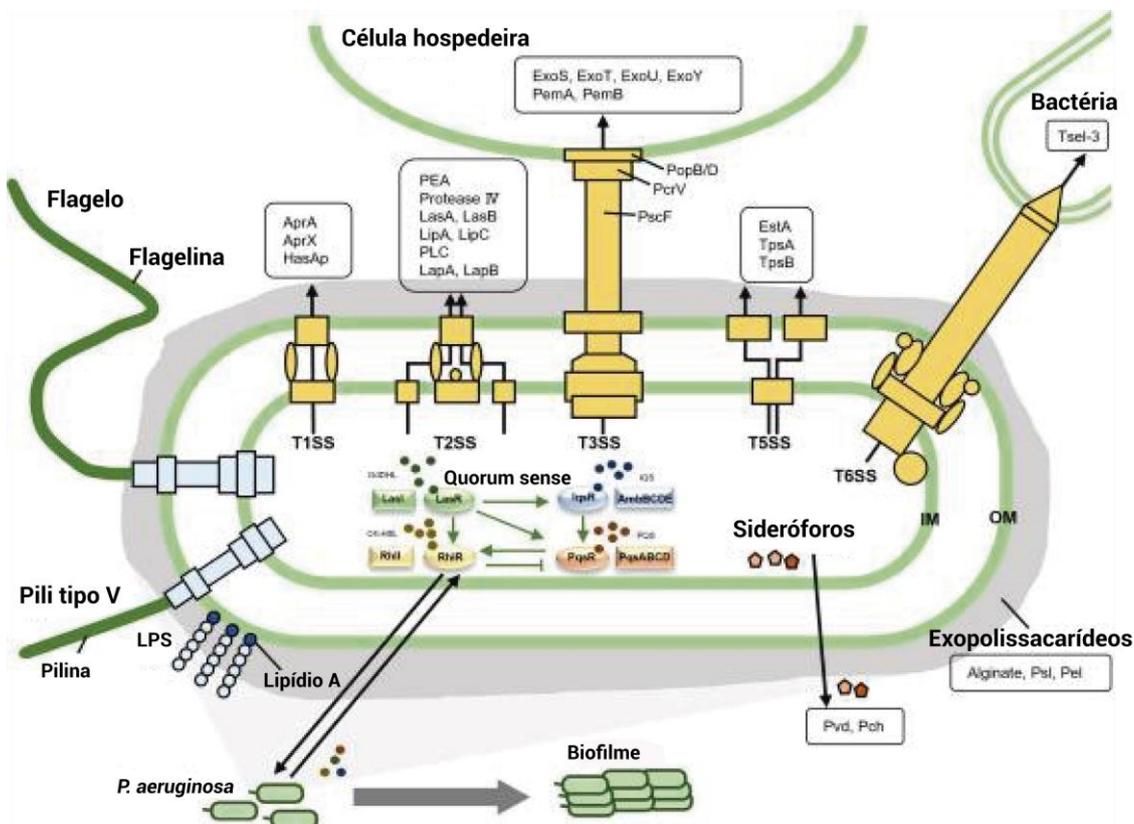
Outros pigmentos, da classe dos sideróforos, contribuem para a homeostase de íons metálicos pelas *Pseudomonas spp.*, como a pioquelina e a piroverdina. A piroverdina possui uma coloração fluorescente verde amarelada (Schalk; Perraud, 2023) sendo identificadas, até então, mais de 100 variações da molécula produzidas por várias cepas e espécies da bactéria, correspondendo a cerca de 20% dos sideróforos microbianos caracterizados (Ghssein; Ezzeddine, 2022). Uma das formas do organismo se defender de uma infecção bacteriana é a partir do processo de imunidade nutricional, no qual as células retêm nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano, tal como o ferro (Kehl-fie; Skaar, 2010). Contudo, a maior parte do ferro disponível em vertebrados está presente dentro das células, associados a proteínas como a ferritina e a porfirina e as condições aeróbias e o pH

do soro sanguíneo dificultam a solubilidade do metal, tornando-o mais escasso para as bactérias (Skaar, 2010). Assim sendo, os sideróforos atuam como biosinalizadores capazes de identificar baixas concentrações de ferro no ambiente e captam o metal a fim de permitir o desenvolvimento adequado da bactéria, sendo, portanto, relevante na patogenicidade da doença por *P. aeruginosa* (Khasheii; Mahmoodi; Mohammadzadeh, 2021).

Além de ser resistente a diversos tipos de antibióticos, a bactéria é capaz de formar biofilmes e sobreviver aos ambientes com pouca concentração de oxigênio entre outras condições mais inóspitas (Qin *et al.*, 2022). Os biofilmes são formados por micro-organismos que aderem entre si e entre superfícies inertes ou tecidos vivos, e formam uma matriz renovável constituída por substâncias poliméricas e extracelulares como proteínas, sacarídeos e ácidos nucleicos (Das; Sehar; Manefield, 2013; Pang *et al.*, 2019). Estudos apontam que os estímulos para a produção do biofilme são decorrentes de situações de estresse ambiental, como administração de antibióticos, radiação ultravioleta (UV), salinidade, pH, danos físicos, exposição a metais, entre outros. Assim sendo, diversos estímulos estressores promovem a produção de biofilmes, que é considerado como uma defesa adaptativa (Núñez *et al.*, 2013; Pang *et al.*, 2019; Walters *et al.*, 2003).

O desenvolvimento dos biofilmes inicia-se com uma ou mais células que se aderem a uma superfície e se replicam formando novas células ao mesmo tempo que produzem e secretam elementos da matriz celular. À medida que o biofilme cresce, as células podem se dispersar e colonizar outras superfícies (Divakar; Lama; Asad., 2019; Sauer *et al.*, 2022). A eficiência dos biofilmes depende também dos componentes da matriz extracelular produzidos pelas células (Jakubovics *et al.*, 2021). Em *P. aeruginosa* as ligações moleculares entre lecitina A e D-galactose e lecitina B e D-manose/L-fucose, por exemplo, formam uma estrutura glicoproteica que auxilia na constituição e adesão do biofilme (Siebs *et al.*, 2022). Ao ser produzido, o biofilme atua como uma barreira que dificulta o acesso de antibióticos e células do sistema imune às bactérias (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Stewart; Costerton, 2001). Esquemáticamente, os fatores de virulência são representados pela Figura 2.

Figura 2 - Esquema representativo de fatores de virulência evidenciados em *P. aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de Liao *et al.* (2022, p. 2).

### 2.1.2 Infecções por *P. aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista que acomete, principalmente, pessoas imunossuprimidas e uma das principais responsáveis em infecções nosocomiais (Blomquist; Nix, 2021). O patógeno apresenta baixas demandas nutricionais e, portanto, consegue se adaptar a diversas condições ambientais e utilizar vários compostos ambientais como fonte de energia (Lyczak; Cannon; Pier, 2000; Ruffin; Brochiero, 2019). Além disso, é capaz de se proliferar em diversos tecidos humanos como pele, ouvido, olhos, coração, sangue, ossos, articulações, pulmões, intestinos, trato urinário e sistema nervoso (Ruffin; Brochiero, 2019), sendo capaz de infectar, praticamente, todos os tipos de tecidos animais (Lyczak; Cannon; Pier, 2000).

Devido a um maior contato com o meio externo, a pele, sistema ocular e vias

respiratórias acabam sendo as vias de maior prevalência da infecção (Spencer, 1953). As infecções cutâneas são mais comuns em casos de lesões de pele como em casos de queimaduras e diabetes, que expõem o tecido favorecendo o crescimento das bactérias (Mayhall, 2003; Mihai *et al.*, 2014). As infecções oculares ocorrem, geralmente, por conta do uso indevido de lentes de contato ou algum trauma de córnea que causa lesão no tecido (Green; Apel; Stapleton, 2008). As infecções urinárias, por sua vez, estão associadas principalmente com a introdução de cateteres. Em pacientes em UTI, cerca de 10% de pacientes que demandam catéter e 16% em cuidados intensivos na mesma condição são acometidos pela infecção (Mittal *et al.*, 2009; Rosenthal *et al.*, 2016). A bacteremia, por sua vez, acaba se alastrando, principalmente, a partir de focos nos sistemas urinário, respiratório entre outras causas desconhecidas sendo que pacientes com neutropenia são mais propensos a essa condição (Choi *et al.*, 2018; Fabre *et al.*, 2019). Quando ocorre uma infecção por *P. aeruginosa* os tecidos lesados apresentam alterações de suas funções e a bactéria reduz a reparação tecidual e prejudica a integridade epitelial (Ruffin; Brochiero, 2019).

Em ambiente hospitalar, diversos equipamentos servem como reservatório do micro-organismo, principalmente os que apresentam algum componente líquido como as máquinas de ventilação assistida e fluídos de administração intravenosa (Paviani; Stadnik; Heinek, 2004). Segundo o Programa de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (Sentry, 2003) a *P. aeruginosa* foi, no Brasil, o patógeno mais frequente em isolados de pneumonia hospitalar, a segunda principal responsável por infecções urinárias, de feridas cirúrgicas e queimaduras e a sétima mais presente em casos de bacteremia entre as unidades hospitalares presentes no estudo (Kiffer *et al.*, 2005; Paviani; Stadnik; Heinek, 2004; Santucci *et al.*, 2003). Além disso, entre 2009 e 2012 a bactéria foi a mais frequente entre os isolados de indivíduos hospitalizados com pneumonia em 28 centros médicos nos EUA e 25 na Europa correspondendo um total de 20,9% das amostras analisadas (Sader *et al.*, 2014). Em um estudo transversal multicentro nos EUA revelou que 36,2% de das bactérias gram-negativas isoladas de pacientes com infecções no trato respiratório inferior em UTI eram *P. aeruginosa* (Claeys *et al.*, 2018).

Nos hospitais brasileiros a bactéria também é recorrente, sendo verificada em 51,9% dos pacientes de UTI em um hospital escola em Belém do Pará (Matos *et al.*, 2016). Entre os anos de 2015 a 2019, foi verificado que o setor de clínica médica de

um hospital escola em Uberaba/MG apresentou a maior incidência dos casos (18%), seguido por UTI adulta (16%), pronto socorro (12%) e os demais setores com 54% dos casos (Costa *et al.*, 2022). Se não tratada logo no início, na fase aguda, a infecção por *P. aeruginosa* pode se alastrar para uma infecção crônica no qual a bactéria pode formar um biofilme, tornando-se mais difícil de ser combatida (Langan; Kotsimbos; Peleg, 2015). Em alguns casos, os indivíduos contraem a infecção na adolescência ou na fase adulta e convivem com a infecção por 20 ou mais anos (Gellatly; Hancock, 2013). Mesmo havendo uma série de locais de proliferação bacteriana, os pulmões acabam sendo o principal alvo da *P. aeruginosa* que levam a pneumonia (Parker *et al.*, 2008; Williams; Dehnbostel; Blackwell, 2010). A infecção por *P. aeruginosa* em pacientes com FC é muito crítico, uma vez que este patógeno é responsável por altos índices de mortalidade e morbidade além de ser a bactéria gram-negativa mais associada a pneumonias nosocomiais (Mogayzel *et al.*, 2014).

O quadro de FC pode se agravar e levar a obstrução do fluxo de ar e a morte tecidual, assim sendo, o tratamento para combater a infecção deve ser rápido e agressivo a fim de se preservar as funções pulmonares (Driscoll; Brody; Kollef, 2007). Mesmo que a progressão da fibrose leve à destruição do tecido, tornando mais anaeróbico, as bactérias conseguem sobreviver por meio de mutações genéticas e por meio da associação de biofilmes (Langan; Kotsimbos; Peleg, 2015). A bronquiectasia, por sua vez, é um quadro respiratório não fibroso no qual os bronquíolos podem sofrer uma dilatação anormal e irreversível, que leva à infecção crônica e inflamação. Esta condição acaba sendo mais comum que a FC e tão prejudicial quanto, fazendo com que o tratamento também seja o mais precoce possível (Bilton, 2008).

De modo geral, as mortes globais por infecções bacterianas resistentes a antibióticos são consideravelmente altas. No estudo mais recente, estimou-se que em 2019, mais de 13 milhões de mortes foram registradas por infecções, sendo 7,7 milhões associadas a 33 patógenos bacterianos. Esse valor corresponde a 13,6% das mortes globais no mesmo ano. O mesmo estudo apontou que as ESKAPE foram responsáveis por 54,9% de mortes associadas a bactérias e somente a *P. aeruginosa* correspondeu a 559,000 casos (Burden, 2022). As infecções associadas a *P. aeruginosa* também representam altos gastos com saúde. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, estimou-se um gasto médio de mais de 36.000 dólares em tratamentos pré-diagnóstico (12 meses) e mais de 67.000 dólares após diagnóstico

(12 meses) por paciente com bronquiectasia não crônica associada a infecção por *P. aeruginosa* (Blanchette *et al.*, 2017). Estimativas apontam que na Europa, cerca de 2,4 milhões de pessoas irão morrer nos próximos 30 anos por conta de infecções decorrentes a micro-organismos resistentes e isso custará cerca de 3,5 bilhões de dólares por ano (Hofer, 2019).

### 2.1.3 Resistência antimicrobiana

Antibióticos são uma classe de medicamentos utilizados para prevenir e tratar infecções bacterianas por meio da destruição dos microrganismos ou reduzindo significativamente a taxa de crescimento e multiplicação das células bacterianas. Em algumas situações as bactérias podem ser capazes de mudar a interação que possuem com os antibióticos de modo a inutilizar a função dos fármacos, conferindo um grau de resistência (Who, 2020). Existem diferentes graus de classificação de resistência bacteriana a antibióticos de acordo como os micro-organismos reagem ao tratamento. As bactérias que apresentam resistência a múltiplas drogas (MDR) são resistentes a pelo menos um tipo de antibiótico de 3 ou mais classes diferentes. As do tipo extensivamente resistentes a drogas (XDR) são resistentes a pelo menos algum antimicrobica em todas as classes (exceto uma ou duas). As pan-resistentes a drogas (PRD) são resistentes a todos os antibióticos testados (Santos *et al.*, 2022). Existe também a classificação de resistência difícil de tratar (DTR) em que a cepa bacteriana é resistente aos antibióticos com alta eficácia e baixa toxicidade, geralmente utilizados como primeira linha de defesa exemplo dos  $\beta$ -lactâmicos incluindo os carbapenemos e fluoroquinolonas no tratamento de bactérias gram negativas como a *P. aeruginosa* (Kadri *et al.*, 2018). A resistência a antibióticos é prejudicial no tratamento de uma infecção e em casos de procedimentos que causam imunossupressão como cirurgias e quimioterapias, situações que o indivíduo pode ser acometido pelas infecções oportunistas ou necessite usar antibióticos de modo preventivo (Martinez, 2014).

Tal fenômeno de resistência bacteriana, evidenciada em diversas espécies e cepas, pode ser fonte de diferentes causas agindo simultaneamente. A resistência intrínseca está relacionada a fatores estruturais e características funcionais da própria bactéria, como por exemplo bomba de efluxo, redução da permeabilidade celular a antibióticos e enzimas de inativação a agentes (Blair *et al.*, 2015). Por outro lado, o

organismo pode adquirir genes de resistência por meio de transferência horizontal, enquanto que a resistência adaptativa é quando a bactéria aumenta suas chances de sobreviver a resposta de um antibiótico por meio da produção de biofilmes, por exemplo (Santos *et al.*, 2022).

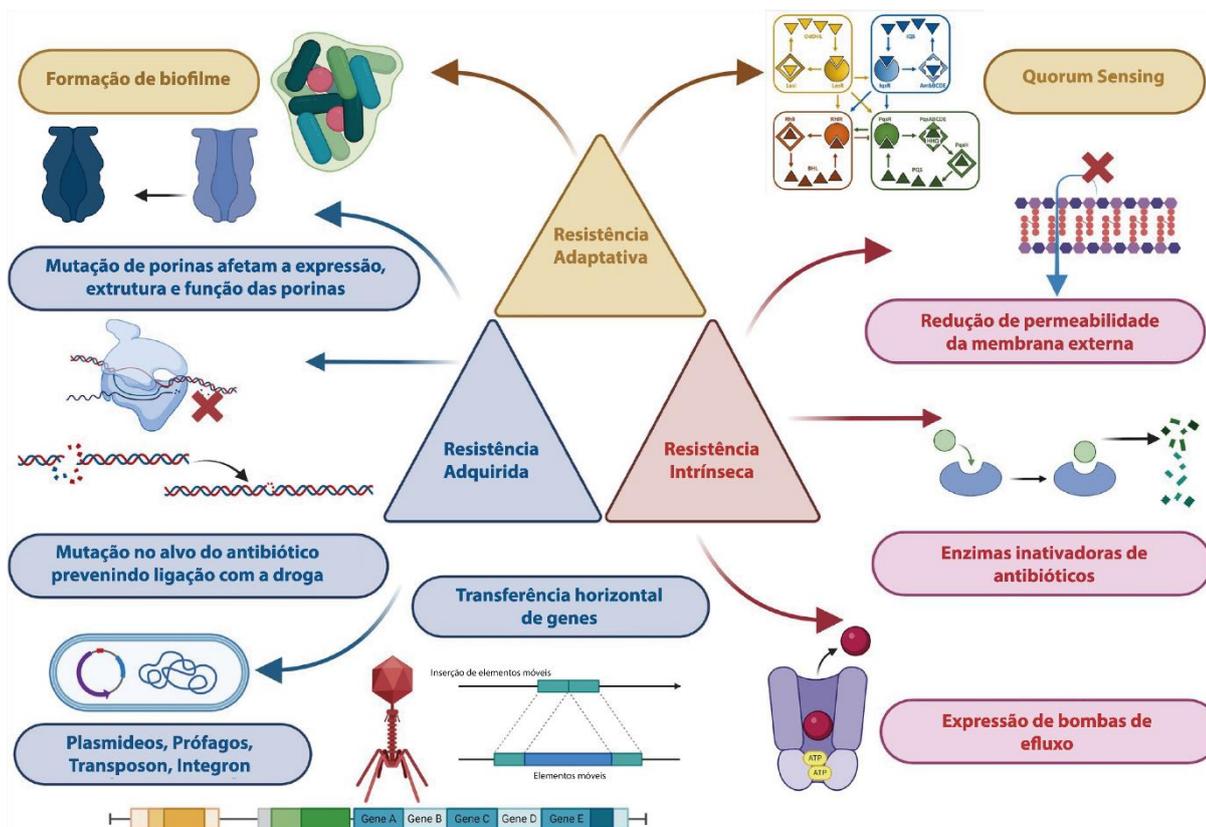
As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa como constituinte de sua parede celular, o que confere uma vantagem em relação às bactérias gram-positivas, pois esta membrana atua como uma barreira semipermeável a substâncias hidrofóbicas, como alguns detergentes, antibióticos e compostos tóxicos (Tamber; Hancock, 2003). Em bactérias gram-negativas, cerca de 50% da massa da parede celular pode corresponder a proteínas e lipoproteínas de membrana ancoradas como as porinas, responsáveis pelo transporte de substâncias através da parede celular (Koebnik; Locher; Gelder, 2000). Antibióticos hidrofóbicos de baixo peso molecular como os  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol e fluoroquinolonas são transportados de modo inespecífico por diferentes porinas e alterações na expressão e na estrutura destas proteínas e na membrana externa como um todo influencia na resistência intrínseca do microrganismo (Delcour, 2009). As bombas de efluxo, por sua vez, surgiram evolutivamente como uma forma de proteger as bactérias de fatores agressores do meio ambiente (Langevin; Dunlop, 2018), tais como os compostos tóxicos produzidos por outras bactérias, antibióticos, antimicrobianos dos hospedeiros além de para excreção de metabólitos (Piddock, 2006). Cada tipo de bomba de efluxo possui sua especificidade e, atualmente, são descritos 6 grandes famílias, que por sua vez abrigam vários tipos de proteínas (Lorusso *et al.*, 2022). Outra estratégia intrínseca das bactérias é a produção de enzimas que neutralizam a ação de antibióticos como no caso das  $\beta$  lactamases com os  $\beta$  lactâmicos (Ambler, 1980). As  $\beta$  lactamases podem ser agrupadas nos grupos A, B, C e D de acordo com sua sequência de aminoácidos e dois de acordo com sua atividade catalítica. O grupo das serina- $\beta$ -lactamases inclui os tipos A, C e D, enquanto que as metalo- $\beta$ -lactamases os tipos B (Bertoncheli; Horner, 2008).

As mutações são eventos no qual ocorre alguma alteração da sequência de bases nitrogenadas do genoma das células. Estas alterações são diversas, podendo ser deleção, substituição, adição, trocas de trechos de nucleotídeos entre outras (Nature Education, 2008). Uma mutação pode ser neutra, benéfica ou prejudicial dependendo de como ela altera o organismo e em casos de mutações não neutras, o mais comum são deleções. Quanto maior o número de pares de bases alterados,

maior o efeito da mutação e maior a chance da mutação ser deletéria (Loewe, 2008). Em *P. aeruginosa* as mutações benéficas para a bactéria podem promover alterações na afinidade dos antibióticos à estrutura alvo ou redução na penetração da droga de tratamento, melhoramento os mecanismos de bombas de efluxo, mudanças em vias metabólicas de degradação de antibióticos, entre outros (Munita; Arias, 2016). Em um estudo realizado por Mandsberg, foi verificado que mutantes de PA01 com menos eficiência no sistema de reparo oxidativo do DNA apresentaram um aumento de 7,5 vezes na frequência de mutação em comparação à cepa de referência sem mutações.

Os mutantes tornaram-se mais virulentos uma vez que apresentaram um aumento na produção de  $\beta$ -lactamases e super expressão de bombas de efluxo MexCD-OprJ, o que resultou em uma maior resistência aos antibióticos de tratamento (Mandsberg *et al.*, 2009). Mutações espontâneas também foram verificadas como fatores de redução de expressão e alteração de função de porinas (Fernández; Hancock, 2012). Isolados clínicos também podem apresentar super expressão na produção de  $\beta$ -lactamases por conta de mutações no gene de beta-lactamases AmpC condicionando uma maior resistência contra cefalosporinas (Berrazeg *et al.*, 2015). O fenômeno de transferência horizontal permite que bactérias compatíveis possam trocar elementos do DNA como plasmídeos, ilhas de patogenicidade/resistência e genes de resistência pelos fenômenos de conjugação e transdução, o que também potencializa a resistência a partir de fatores intrínsecos ou mutações obtidas pelas bactérias (Breidenstein; Núñez; Hancock, 2011).

Por outro lado, a resistência adaptativa consiste em alterações temporárias no funcionamento da bactéria frente a um estímulo e após cessado, a célula retorna as suas condições iniciais, tal como é verificado na formação dos biofilmes (Motta; Aldana, 2016). As três principais origens da resistência bacteriana são representadas pela Figura 3.

Figura 3 - Fatores de resistência em *P. aeruginosa*.

Fonte: Adaptado de Elfadadny *et al.* (2024).

#### 2.1.4 Resposta imunológica contra *P. aeruginosa*

A resposta imunológica contra *P. aeruginosa* se inicia logo no início da infecção por meio da interação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos nas bactérias com os respectivos receptores das células do sistema imunológico (Moser *et al.*, 2021). Em sua superfície celular, a *P. aeruginosa* possui LPS e flagelo, constituído por flagelina, que são alvos reconhecidos, respectivamente pelos *Toll Like Receptors* (TLR) 2,4 e 5 expressos em diversas células da imunidade inata (Lavoie; Wangdi; Kazmierczak, 2011; Moser *et al.*, 2021; Raoust *et al.*, 2009). Em infecções pulmonares bem estabelecidas, o epitélio de revestimento já inicia o combate ao patógeno, uma vez que até atingir o nível dos pulmões, as bactérias devem passar por um epitélio pseudoestratificado que produz uma série de substâncias como citocinas e quimiocinas que recrutam e ativam células de defesa inata e adaptativa (Gellatly; Hancock, 2013; Holt *et al.*, 2008).

Entre os fagócitos, os macrófagos são umas das primeiras linhas de defesa que

possuem mobilidade e capacidade de fagocitar o patógeno (Raoust *et al.*, 2009). Além disso, quando ativadas, estas células fazem a secreção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) (Raoust *et al.*, 2009). Os neutrófilos também são bastante ativados ao longo da infecção, contudo, uma resposta imune muito intensa pode levar a danos teciduais devido a degranulação desencadeada por estas células (Gellatly; Hancock, 2013). As células dendríticas (DC), por sua vez, são um tipo de apresentador de antígeno para outros tipos celulares, fazendo uma conexão entre imunidades inata e adaptativa, ativando e regulando as respostas imunes como a ativação das células T em Th1, Th2 ou Th17 (Moser *et al.*, 2021; Zuber *et al.*, 2008).

Outros receptores celulares como os *NOD-Like Receptors* (NLRs) que são expressos no núcleo e citoplasma (Alhazmi, 2018) foram, recentemente, reconhecidos como parte essencial da ativação da resposta inata e mediação da resposta inflamatória no hospedeiro (Alhazmi, 2018; Franchi; Planillo; Núñez, 2012). Em resposta a danos teciduais e toxinas bacterianas, os NLRs podem ser ativados junto a outras proteínas que formam o inflamossomo induzindo a piroptose, um tipo de morte celular programada, a partir da via de sinalização de caspase-1 (Alhazmi, 2018; Morris *et al.*, 2015). A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) é um dos produtos secretados na via da caspase-1 em infecções pela *P. aeruginosa* que contribui com a manutenção da resposta inflamatória e recrutamento de mais neutrófilos. Contudo, a ativação de IL-1 $\beta$  e outros componentes do sistema imune não são unicamente dependentes da via de caspase-1 (Karmakar *et al.*, 2012; Lavoie; Wangdi; Kazmierczak, 2011).

Em casos de sepse, em que o micro-organismo fica circulante no sangue, o sistema complemento desempenha um importante papel no combate do patógeno marcando as bactérias para serem fagocitadas ou induzindo-as a um processo de lise por meio do complexo de ataque a membrana (Alsina *et al.*, 2023). O sistema complemento é caracterizado por três vias, a clássica, via das lecitinas e via alternativa todas mediadas por meio da proteína comum C3 (Alsina *et al.*, 2023).

Na infecção por *P. aeruginosa*, diversas proteínas são ativadas para a destruição do patógeno. A proteína C5 ao ser clivada promove a liberação de fragmentos que induzem a quimiotaxia de neutrófilos, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de vesículas lisossomais de fagócitos. Além disso, C5 contribui com o recrutamento de macrófagos nos pulmões (Alsina *et al.*, 2023; Parrish *et al.*, 1984). Em um estudo com camundongos deficientes em C3, C4 e fator B,

Mueller verificou que a ativação do sistema complemento por meio da via alternativa é essencial para a sobrevivência dos animais em infecção por *P. aeruginosa* por induzir opsonização e fagocitose da bactéria (Mueller; Ortiz; Drouin; Wetsel, 2004).

As citocinas também apresentam grande relevância no combate da infecção bacteriana, Gosselin (1995), verificou que a presença do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) é essencial para a redução de carga bacteriana nos pulmões de camundongos infectados por *P. aeruginosa* (Gosselin *et al.*, 1995). As Interleucinas (IL) também são caracterizadas na infecção bacteriana. Em pacientes acometidos pela FC, a IL-17 está relacionada com os processos de maturação e recrutamento dos neutrófilos a partir da indução de fatores de crescimento e quimiocina. A IL-23 demonstra um importante papel no recrutamento de neutrófilos e contribuição no controle de IL-17 a partir das células T $\gamma\delta$ . (Dubin *et al.*, 2012). Estas linhagens de células T, por sua vez, são presentes em mucosas e tecidos epiteliais e reconhecem antígenos a partir do complexo MHC (Prinz; Santos; Pennington, 2013). A partir de citocinas e quimiocinas, as células T $\gamma\delta$  promovem a ativação e diferenciação de monócitos, neutrófilos e células dendríticas (Moore *et al.*, 2000). Além disso, as células T $\gamma\delta$  demonstram ser importantes co-estimulantes de células B para a produção de anticorpos contra o patógeno (Curran; Bolig; Parizi, 2018; Pan *et al.*, 2016). Outras linhagens de células T são essenciais no combate da infecção mediando a imunidade protetiva e integrando as defesas inatas e adaptativas (Sharma; Krause; Worgall, 2011).

Quando a infecção se torna crônica, é comum que a *P. aeruginosa* forme biofilmes e a matriz extracelular esconda os PAMPs reduzindo seu contato com o sistema imune. Além disso, essas mesmas estruturas podem ser menos expressas, como no caso dos flagelos (Moser *et al.*, 2021; Tart; Wolfgang; Wozniak, 2005). As principais respostas imunes contra os biofilmes são os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células NK e sistema complemento (Moser *et al.*, 2021). A ação dos neutrófilos pode induzir um contínuo dano tecidual por conta de lesões proteolíticas e oxidativas e levar a uma depleção de O<sub>2</sub> em pulmões infectados pela bactéria, ocasionando em redução na função dos pulmões (Houston *et al.*, 2013; Starosta *et al.*, 2006). Devido a cronicidade da infecção, os indivíduos apresentam grandes quantidades de anticorpos contra componentes da matriz dos biofilmes como os polissacarídeos. Contudo, essa estrutura de resistência bacteriana é resistente ao fenômeno de opsonização, dificultando a eliminação do patógeno (Bruderer *et al.*,

1992; Høiby *et al.*, 2001). Uma das problemáticas da infecção crônica é nos danos teciduais decorrentes a super-expressão do sistema imune, o que faz com que os linfócitos Th1 e Th2 atuem constantemente com suas respostas pró e anti-inflamatória (Sharma; Krause; Worgall, 2011).

### 2.1.5 Tratamentos e imunoprofilaxia

Em pacientes com suspeita de infecção por *P. aeruginosa*, principalmente os acometidos em UTI, deve-se fazer uma obtenção de cultura para confirmação do patógeno e administração de antibiótico adequado (Reynolds; Kollef, 2021). Mais comumente a infecção pode ser tratada com uma associação de  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos. Pode-se recorrer também a classe dos carbapenêmicos com quinolonas em associação com os aminoglicosídeos (Loewe, 2008). Contudo, a resistência a antibióticos verificada em cepas da bactéria dificulta o tratamento, o que leva a busca de novas alternativas terapêuticas (Pang *et al.*, 2019; Reynolds; Kollef, 2021).

Os novos antibióticos que estão sendo desenvolvidos como o doripenem, plazomicina e o POL7001 mostram-se mais efetivos no tratamento da *P. aeruginosa* e induzem menor resistência às bactérias em comparação às drogas disponíveis atualmente, devido a maior eficiência no sistema de entrega e maior resistência às enzimas bacterianas (Chatterjee *et al.*, 2016; Pang *et al.*, 2019). O doripenem é um novo antibiótico da classe dos carbapenêmicos com grande espectro de atividade em bactérias gram-positivas e negativas por conta do seu potencial de inibir a síntese de parede celular. A substância foi aprovada pela *Food and Drug administration* (FDA) no tratamento de infecções intra-abdominais de maior complicação e para infecções no trato urinário (Greer, 2008; Pang *et al.*, 2019; Paterson; Depestel, 2009). A plazomicina, por outro lado, é um aminoglicosídeo sintético derivado da sisomicina (Aggen *et al.*, 2010). A molécula apresenta grande atividade, *in vitro*, contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e possui atividade similar a da amicacina em cepas de *P. aeruginosa* MDR (Walkty *et al.*, 2014). Além disso, o composto apresentou, *in vitro*, atividade sinérgica quando combinados com outras classes de antibióticos como cefepima, doripenem e imipenem (Pankuch *et al.*, 2011). Outro antibiótico promissor é o POL7001 que pertence a classe dos epítopos de proteínas miméticas (PEM), que possui a capacidade de inibir o transporte de LPS até a membrana externa

da bactéria (Srinivas *et al.*, 2010). Em um estudo testando a eficiência da molécula *in vitro* e em modelos murinos, Cigana (2016), verificou uma eficiência inibitória em isolados clínicos de pacientes com FC de *P. aeruginosa* MDR além de que o POL7001 reduziu significativamente os níveis de inflamação crônica e aguda em pulmões de animais desafiados com a bactéria (Cigana, 2016).

Por outro lado, o uso indevido de antibióticos é uma preocupação por conta de seleção de bactérias resistentes aos medicamentos, além de que o desenvolvimento de novos fármacos é complexo e demanda tempo (Pang *et al.*, 2019; Ventola, 2015). A fagoterapia consiste no uso de bacteriófagos/fagos que são vírus que infectam bactérias e podem causar lise das células hospedadas de acordo com seu ciclo de vida (Clokier *et al.*, 2011). Os fagos existem em todos os ambientes o qual seu hospedeiro coexiste e os infectam de modo específico (Kakasis; Panitsa, 2019). As principais vantagens da fagoterapia incluem a replicação direta do vírus no sítio de infecção com alta especificidade da bactéria alvo sem causar danos na microbiota do indivíduo. Além disso, o tratamento é de fácil administração e pode combater microorganismos resistentes a antibióticos (Kakasis; Panitsa, 2019). Além disso, pode-se usar de engenharia biológica para melhorar o uso dos fagos que além de infectarem as bactérias podem carrear alguma substância que auxilie no combate dos microorganismos (Pang *et al.*, 2019).

Outra abordagem são as vacinas, no qual o objetivo é prevenir a infecção antes que ela se estabeleça no indivíduo por meio de um estímulo no sistema imunológico que se torna mais capaz de combater o patógeno. Contudo, atualmente, não há vacinas para o tratamento de *P. aeruginosa* (Priebe; Diseases; Goldberg, 2015). Existem vários componentes capazes de desenvolver uma resposta imunológica em um hospedeiro infectado por *P. aeruginosa* e, portanto, são alvos vacinais. As principais estruturas antigênicas são o LPS e as proteínas de membrana por serem mais superficiais e de mais fácil interação com o sistema imune. Além disso, existem vários candidatos vacinais que fazem uso das células totais da bactéria morta ou atenuada, vesículas celulares, pili e flagelo (Solanki; Tiwari, 2019). Em pacientes acometidos por FC os pulmões possuem uma alteração na produção de muco, redução de atividade fagocítica, recrutamento de macrófagos e resposta inflamatória desregulada. Estes fatores prejudicam a eficácia de uma vacina, pois para que este tratamento seja eficaz é necessária uma ação conjunta com o sistema imunológico (Grimwood *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2019).

As nanopartículas (NPs), por sua vez, ganham cada vez mais atenção já sendo testadas no tratamento de doenças como o câncer e infecções bacterianas. As NPs podem ser produzidas de diferentes materiais e apresentar diferentes aplicabilidades de acordo com suas propriedades (Jeevanandam *et al.*, 2018; Salata, 2004). Entre as propriedades mais importantes para o uso das NPs em infecções bacterianas destacam-se: alta capacidade de penetração nas membranas bacterianas, capacidade de inibir ou destruir biofilmes, atividade antimicrobiana e de substâncias com ação bactericida (Pang *et al.*, 2019; Wang; Hu; Shao, 2017).

As nanopartículas metálicas, como as de prata, demonstram bons resultados na inibição de crescimento de *P. aeruginosa in vitro* devido ao mecanismo de liberação de íons de prata que inibem a ação de enzimas essenciais para o micro-organismo, como o processo de síntese de DNA (Pang *et al.*, 2019; Wang; Hu; Shao, 2017). Contudo, a prata também apresenta um certo grau de toxicidade em células de mamíferos, sendo necessário mais evidências e estudos *in vivo* sobre a aplicabilidade e segurança do tratamento (Salomoni *et al.*, 2017). Logo, a maior desvantagem da aplicabilidade deste tratamento é a toxicidade além de que a considerável área de superfície das NPs pode levar a reações indesejáveis no organismo e a facilidade de transporte pode levar a toxicidade sistêmica (Elsaesser; Howard, 2012; Gwinn; Vallyathan, 2006; Yildirim *et al.*, 2011).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas são substâncias particuladas com dimensões 1 até 100 nm de tamanho que podem ser constituídas por diferentes materiais, apresentando diferentes propriedades físicas e químicas que os mesmos materiais de sua produção em escala macroscópica (Hirano, 2009). Em 2008, a organização internacional para padronizações (Iso) definiu o conceito de nanopartículas como uma categoria de nano-objetos. Seguindo a hierarquia de classificação da norma técnica, as NPs são objetos no espectro de tamanho de 1 a 100 nm em três dimensões, seguindo uma tendência esférica. As nanofibras, por exemplo, comportam-se como um fio apresentando comprimentos longos com uma dimensão fugindo do intervalo até 100 nm enquanto que as nanoplacas possuem 2 dimensões fora do intervalo, apresentando uma espessura entre 0 a 100 nm (ISO/TS 27687, 2008). Contudo, em 2011, a União Europeia propôs e adotou uma definição mais abrangente, sendo ela:

a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an [aggregate](#) or as an agglomerate and where, for 50% or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm–100 nm ([COMMISSION RECOMMENDATION, 2011](#))

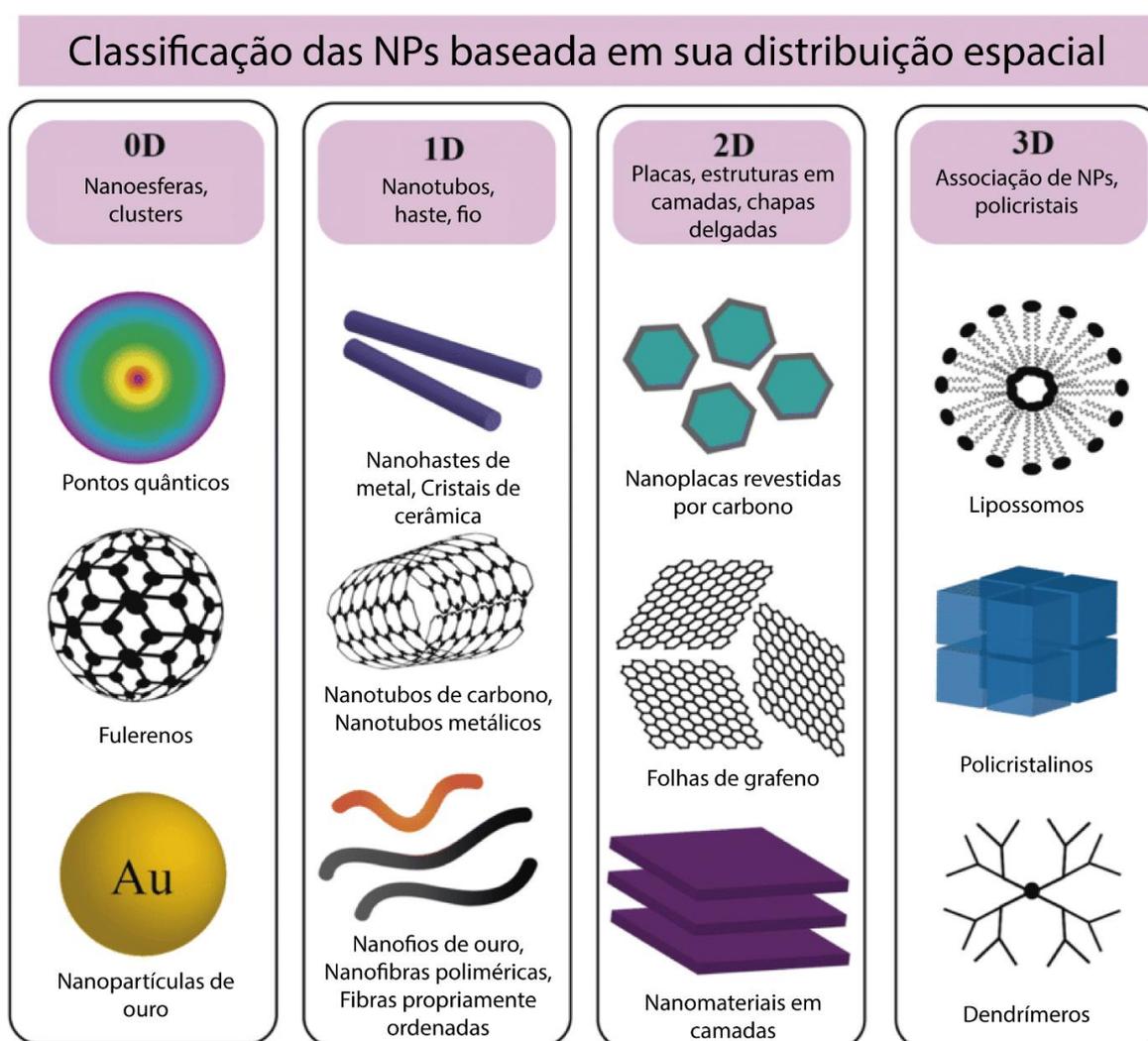
As NPs podem ser classificadas em diversos aspectos como morfologia, tamanho, formato, constituintes, propriedades físico-químicas entre outros (Ijaz *et al.*, 2020). Ao caracterizar-se as dimensões das NPs pode-se recorrer a seguinte classificação baseada nas respectivas categorias: 0-D quando as três dimensões estão no espectro de 0-100 nm; 1-D e 2-D possuem, respectivamente, uma e duas dimensões dentro do espectro nanométrico. No caso das nanopartículas 3-D, o sistema é composto por uma série de dispersões de nano-objetos como nanotubos, dispersões e matrizes de nanofios que não estão no espectro das nanopartículas (Joudeh; Linke, 2022).

Na questão da composição, existem três grupos de classificação: orgânicas, baseadas em carbono e inorgânicas. No grupo das inorgânicas há uma série de formulações incluindo os subtipos de NPs metálicas. Quanto as baseadas em carbono há uma série de hidrocarbonetos como o grafeno e fulereno (Ealias; Saravanakumar, 2017). No grupo das nanopartículas orgânicas, por sua vez, encontram-se moléculas como ferritina, dendrímeros, micelas e lipossomos. Alguns tipos de nanopartículas como as micelas e os lipossomos possuem um interior oco conhecido como nanocápsula, além de serem sensíveis ao calor e a luz (Venturini, 2019). Na Figura 4, resume-se algumas características e classificação das NPs.

Na área médica, as NPs apresentam uma série de aplicações focadas no tratamento de doenças, diagnóstico e monitoramento e como veículo de transporte de fármacos sem gerar muitos danos e efeitos colaterais aos indivíduos tratados. (Lin, 2015). Outras vantagens que podem ser exploradas na síntese e aplicação das nanopartículas é que podem ser biodegradáveis, podem apresentar baixa toxicidade ao organismo e podem possuir ação adjuvante, sendo de modo geral biocompatíveis e seguras (Su; Kang, 2020). Por estes e outros fatores as NPs são exploradas nas áreas da saúde como entregadores de fármacos em sítios específicos. Este mecanismo vem sendo explorado como alternativa na área da oncologia como um meio de reduzir danos dos tratamentos convencionais (Misra; Acharya; Sahoo, 2010; Mundekkad; Cho, 2022). As NPs também são amplamente exploradas na área da

vacinologia, empregadas como nanovacinas de modo a serem associadas ou preparadas com algum antígeno responsável por estimular o sistema imunológico, atuando como adjuvantes (Priyanka *et al.*, 2023). Esta técnica é muito promissora, podendo ser delineada para o tratamento de tumores e doenças infecciosas de acordo com as características de cada tipo de NPs utilizadas e no alvo celular. Contudo, o desenvolvimento de nanovacinas pode ser um processo caro e que demanda muito tempo de pesquisa envolvido para se alcançar um produto seguro e eficaz (Gurunathan *et al.*, 2024; Priyanka *et al.*, 2023).

Figura 4 - Classificação e exemplificação de tipos de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de Poh *et al.* (2018, p. 3).

A vacinologia é outra área promissora que vem explorando o uso de nanomateriais. As NPs podem ser utilizadas como vacinas apresentando um efeito adjuvante ao aumentar a estimulação do sistema imunológico junto a um epítipo

(Kheirollahpour *et al.*, 2019). Outra aplicabilidade é de se fazer o uso das NPs como um agente mimético de um vírus ao apresentar um material genético encapsulado por proteínas, podendo ou não ser associado a outros epítomos sem induzir patogenicidade (Mamo; Poland, 2012; Reed; Orr; Fox, 2013).

Contudo, apesar dos avanços na área de biomateriais, as nanopartículas podem se demonstrar tóxicas (Kumah *et al.*, 2023). As características e propriedades físico-químicas como tamanho, área de superfície, carga e estado de agregação molecular são variáveis relacionadas a toxicidade das NPs (Wu; Tang, 2018). Além disso, assim como um fármaco ou substância de abuso ou composto químico, a toxicidade depende das variáveis de tempo de exposição e via de administração (Missaoui; Arnold; Cummings, 2018). A inalação não intencional de nanopartículas pode levar a irritações e inflamações crônicas de pulmão por desencadeamento de resposta imune, o que pode levar a danos teciduais e problemas respiratórios a longo prazo (Inoue; Takano, 2011; Shi *et al.*, 2013). A silicose, por exemplo, é uma doença caracterizada pela exposição prolongada com sílica e nanomateriais derivados do elemento químico (Silva *et al.*, 2022). Nanopartículas a base de óxido de cobre podem ser tóxicas para órgãos como rins e fígado ao serem metabolizadas e se acumularem nestes tecidos (Chen *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2008). Assim sendo, a toxicidade das NPs deve ser uma preocupação no delineamento de um tratamento ou via de administração. Uma forma de tornar as NPs mais seguras é utilizando biomoléculas como nanoemulsões, lipídios, proteínas, polissacarídeos, surfactantes entre outras substâncias seguras. Estudos apontam que muitos dos efeitos tóxicos associados com as NPs são provenientes de matrizes sólidas e com compostos metálicos (McClements, 2010; Missaoui; Arnold; Cummings, 2021).

### **2.2.1 Nanopartículas e resposta imunológica**

Diversos estudos com nanopartículas são feitos na área biomédica e um dos principais focos está na interação entre as NPs e o sistema imune. Tal interação pode ser com o propósito de inibir ou estimular a imunidade além de que as NPs podem ser projetadas para não ter interação imunológica com o organismo (Zolnik *et al.*, 2010). Na área da vacinologia, comumente utilizam-se os patógenos e toxinas inativadas ou estruturas reativas ao sistema imune. Por outro lado, algumas vacinas fazem uso de peptídeos, proteínas recombinantes entre outras estruturas mais seguras, mas com

menor potencial imunogênico. Assim sendo, os adjuvantes tornam-se necessários como uma forma de otimizar a resposta imune e permitir um melhor sistema de entrega (O'hagan; Rappuoli, 2004; Peek; Middaugh; Berkland, 2008; Akagi; Baba; Akashi, 2011). Portanto, é essencial que as NPs, ao serem aplicadas na área médica, sejam adjuvantes e sistemas de administração eficientes e seguros para induzir uma resposta imunológica duradoura e eficaz (Akagi; Baba; Akashi, 2011).

Quando as NPs entram na circulação sanguínea, rapidamente elas entram em contato com componentes do sistema imune podendo ser absorvidas por monócitos, leucócitos, células dendríticas e fagócitos residentes em tecidos. Quando internalizadas, as NPs podem ser processadas por diferentes vias metabólicas, que podem ser facilitadas por opsonização mediante a ligação de proteínas do sistema complemento na superfície das nanopartículas (Dobrovolskaia *et al.*, 2009; Dobrovolskaia; Mcneil, 2009). Este processo deve ser levado em conta ao se projetar um tratamento, pois essa absorção e processamento pode reduzir significativamente a quantidade de NPs e dificultar a chegada em um alvo específico (Dobrovolskaia *et al.*, 2009).

As propriedades das NPs como tamanho da partícula, morfologia, composição, carga elétrica superficial, estrutura química, hidrofobicidade entre outras vão determinar como será a resposta com o sistema imune (Aggarwal *et al.*, 2009; Akagi; Baba; Akashi, 2011; Zolnik *et al.*, 2010). De acordo com sua constituição, as NPs podem induzir uma resposta inflamatória ao interagirem com os padrões de reconhecimento de receptores (PRR) das células do sistema imune inato (Boraschi *et al.*, 2017). Alguns estudos apontam que NPs de coloides de ouro, dendrímeros, polímeros, de lipídios entre outros materiais podem iniciar uma imunoestimulação mediada pela produção de citocinas inflamatórias (Fifis *et al.*, 2004; Zolnik *et al.*, 2010). Assim sendo, em tratamentos com NPs, deve-se investigar se a nanopartícula induz alguma antigenicidade pois as células do sistema imune como os linfócitos B podem produzir anticorpos contra o material. Logo, a neutralização das NPs pode prejudicar a ação do tratamento. Em alguns casos, a imunogenicidade pode ocorrer em relação ao agente transportado pela NP ou por ambos (Dobrovolskaia; Mcneil, 2009).

Existem quatro mecanismos descritos para absorção de nanopartículas a partir das células do sistema imune sendo elas: pinocitose, macropinocitose, fagocitose e endocitose mediada por clatrina. A pinocitose e macropinocitose envolvem a internalização das NPs pelas células de modo não específico junto a fluídos (Liu,

Yuanchang *et al.*, 2018; Pricop; Andrieş, 2015). Em um trabalho, Gu (2011) verificou que macrófagos do tipo RAW 264.7 internalizam NPs de óxido de ferro a partir de endocitose dependente de clatrina e macropinocitose (Gu *et al.*, 2011). Kuhn, por sua vez, mostrou que NPs de poliestireno de 600 nm são engolfadas por macropinocitose e fagocitose enquanto que as mesmas NPs, mas com 40 nm foram internalizada por endocitose mediada por clatrina, fagocitose ou macropinocitose por macrófagos J774.1A (Kuhn *et al.*, 2014). Em nanopartículas de ouro, Tomić, verificou que as NPs de 10 nm e 50 nm foram internalizadas por células dendríticas a partir de endocitose mediada por clatrininas, mas as NPs de menores dimensões foram mais absorvidas (Tomić *et al.*, 2014). O tamanho também influencia na produção de EROs e citocinas inflamatórias mediado pelas células do sistema imune, como evidenciado por Oh *et al* ao comparar nanopartículas ocas de sílica e titânio de 50µm e 125µm. Neste caso, as NPs de menor diâmetro induziram uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e maior indução das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-  $\alpha$  em macrófagos alveolares (J774.1) de camundongo, *in vitro* (Oh *et al.*, 2010).

No caso da hidrofobicidade, alterando as propriedades na superfície das NPs, muda-se os receptores que farão o reconhecimento da estrutura, o que leva a uma interação diferente com o sistema imune (Liu, Yuanchang *et al.*, 2018). Liu verificou que aumentando-se a hidrofobicidade aumentou a internalização das NPs por DC e aumentou a expressão de marcadores CD86 (Liu, Yuan *et al.*, 2013). Por outro lado, as cargas elétricas na superfície das NPs podem interagir com proteínas séricas e do sistema complemento formando um envoltório que pode mediar uma resposta imune. Em NPs de ouro catiônicas, a resposta imune de macrófagos foi mediada a partir dos ligantes nas nanopartículas que formaram uma camada denominada “proteína coroa” (Kiehn; Car, 2017; Liu, Yuanchang *et al.*, 2018). Com uma menor adsorção de proteínas sérica em sua superfície, NPs de ouro zwitteriônicas do tipo *corona free* apresentaram uma menor absorção por macrófagos quando comparadas as NPs de ouro catiônicas. Assim sendo, as NPs ficam mais tempo circulantes no sangue, o que pode aumentar as possibilidades de atividade hemolítica por conta do não processamento das NPs (Moyano *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2012).

De modo geral, quando a superfície das NPs interage com proteínas séricas, as nanopartículas são marcadas como invasoras para reconhecimento por receptores especializados como por exemplo os TLRs (Liu, Yuanchang *et al.*, 2018). Moléculas catiônicas são internalizadas mais facilmente pelas células, incluindo os fagócitos

como macrófagos e DC devido à atração por moléculas carregadas negativamente como os proteoglicanos de superfície celular (Karlsson; Lilja; Björnsson, 2000; Kwon *et al.*, 2005). A opsonização também demonstrou ser um importante fenômeno no processamento das NPs que quando incubadas em soro plasma, rapidamente são opsonizadas pela via alternativa mediada por C3 (Liu, Yuanchang *et al.*, 2018).

### 2.2.2 Nanopartículas de albumina sérica bovina

A albumina sérica (SA) é a proteína mais abundante encontrada no plasma sanguíneo dos vertebrados, apresentando uma série de funções fisiológicas no organismo como auxiliar no transporte de ácidos graxos e bilirrubina e contribuir com a pressão osmótica do sangue (Kajal; Pathania, 2021; Merlot; Kalinowski; Richardson, 2014). A proteína é sintetizada no fígado e liberada na corrente sanguínea, podendo ser encontrada no líquido intersticial e em casos patológicos pode ser encontrada em grandes quantidades na urina e em ascite (Moman; Gupta; Varacallo, 2022). Composta por uma sequência de 585 aminoácidos e pesando cerca de 66 kDa, a Albumina Sérica Humana (HSA) possui 67% de sua estrutura terciária composta por  $\alpha$ -hélices e uma abundância em resíduos carregados como lisina e ácido aspártico (Quinlan; Martin; Evans, 2005).

Diferentemente de outras proteínas mais sensíveis, a HSA demonstrou-se estável em faixas de pH entre 4 a 9, temperatura de 60°C por 10 horas e em solventes orgânicos (Fasano *et al.*, 2005; Kratz, 2008). Além disso, a proteína vem sendo explorada como um carreador de substâncias pelo fato de ser biodegradável, atóxica, facilmente metabolizada, não imunogênico, fácil de purificar, solúvel em água e passível de ser administrada por injeção (Elzoghby; Samy; Elgindy, 2012; Panel; Model, 2000; Rahimnejad; Jahanshahi; Najafpour, 2006). Por outro lado, a Albumina Sérica Bovina (BSA) apresenta um peso molecular de 69.323 Da e um ponto isoelétrico de 4,7 em água a 25°C, sua estrutura primária possui 584 aminoácidos que correspondem a 75,6% de homologia com a HSA (Ketrat; Japrun; Pongprayoon, 2020). Além de diversas propriedades similares com a HSA, a BSA destaca-se por ser mais barata, possuir mais fácil obtenção e purificação e ser amplamente aceita pela indústria farmacêutica, inclusive como um carreador de fármacos (Bujacz, 2012; Elzoghby; Samy; Elgindy, 2012).

Existem diferentes protocolos de preparo das NPs de BSA, sendo que os mais

comuns são baseados em: dessolvatação ou coacervação, emulsificação e geleificação térmica, sendo que novas técnicas podem ser desenvolvidas e aprimoradas. (Elzoghby; Samy; Elgindy, 2012). A coacervação é um fenômeno de separação de um sistema em duas fases líquidas em um sistema coloidal. A fase mais concentrada com o componente coloidal é o coacervado e a outra fase é a solução de equilíbrio (Rahimnejad; Mokhtarian; Ghasemi, 2009). Nesta etapa a albumina é dissolvida em solução aquosa sob agitação magnética em pH variando entre 5 a 9 dependendo da técnica e adiciona-se um agente de dessolvatação como o etanol ou acetona até que o sistema adquira uma cor opalescente e origine as NPs (Elzoghby; Samy; Elgindy, 2012; Langer *et al.*, 2003). O agente de dessolvatação tem por objetivo reduzir as interações químicas da solução aquosa com as proteínas, fazendo com que estas biomoléculas se associem e formem as nanopartículas (Khramtsov *et al.*, 2021). Contudo, a fim de se estabilizar as nanopartículas é necessário a adição de um agente de reticulação como o glutaraldeído, responsável por fazer ligações entre o grupo aldeído e as funções nitrogenadas da proteína, pelo contrário, as proteínas tendem a se solubilizar novamente em solução aquosa (Sundar; Kundu, 2010). A concentração do glutaraldeído no sistema influencia no nível de reticulação das NPs e, conseqüentemente, na propriedade de biodegradação (Weber *et al.*, 2000).

Após a estabilização do sistema, procede-se com a etapa de purificação a fim de se remover o excesso do agente reticulante e de proteínas não ligantes. Nesta etapa, centrifuga-se o sistema, descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se as nanopartículas em tampão adequado (Merodio *et al.*, 2001). O método de síntese da NP por coacervação é representado na Figura 5. A emulsificação é um processo no qual misturam-se dois líquidos imiscíveis através de processos específicos de modo que o sistema se torne, microscopicamente, uma mistura heterogênea (David; Akhondi., 2023). Com base nesse fenômeno, é possível produzir nanopartículas misturando vagarosamente BSA diluído em um solvente polar como óleo em solução aquosa e submetendo o sistema a agitação magnética com a ação de calor ou de uma substância surfactante. Esse processo promove a agregação das proteínas e formando as NPs que, posteriormente, devem ser separadas do solvente orgânico, o que dificulta a técnica e pode ser tóxico (Jahanshahi; Babaei, 2008; Sundar; Kundu, 2010).

A geleificação, por sua vez, é uma propriedade no qual uma substância forma uma estrutura tridimensional a partir de ligações cruzadas de caráter físico e químico,

sendo capaz de formar um gel a partir de mudanças de temperatura e pH, deixando o sistema com características entre um líquido e um sólido (Kesting, 1985). Quando aquecidas, as proteínas se desnaturam e perdem sua estrutura, expondo mais sua superfície e resíduos hidrofóbicos que podem interagir e formar pontes dissulfeto entre outras interações moleculares (Hu; Yu; Yao, 2007). Após o resfriamento do sistema, formam-se ligações de hidrogênio entre os átomos presentes nas proteínas e o composto torna-se mais elástico, formando as NPs (Mine, 1995).

Figura 5 - Síntese de nanopartículas pelo método de coacervação.



Fonte: Adaptado de Patrascu *et al.* (2023, p. 3).

### 2.3 ÁCIDO POLININOSÍNICO:POLICITILDÍLICO (POLI I:C)

O Ácido poliinosínico-policitidílico (Poli I:C) é um análogo de RNA dupla fita (dsRNA) sintético que tem grande efeito imunoestimulante, importante indutor de interferons (IFNs) (Field *et al.*, 1967; Li *et al.*, 2012). Essa estrutura de dsRNA é um tipo de PAMP associado a alguns vírus, o que faz com que o Poli I:C seja um bom agente mimético a vírus de RNA dupla fita e apresente uma ação adjuvante a ser explorada (Hafner; Corthésy; Merkle, 2013).

Quando em contato com as células do sistema imune, o Poli I:C pode levar a maturação de células apresentadoras de antígeno, indução de IFNs  $\alpha$  e  $\beta$ , citocinas pró-inflamatórias, tais como as IL-6, IL-12 e TNF $\alpha$  e citocina de sobrevivência IL-15

(Morris *et al.*, 2015). O poli I:C tem afinidade de ligação por receptores TLR-3 que são expressos em na membrana de linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Os TLR-3, por sua vez, são bem conhecidos por desencadear respostas inatas contra diferentes tipos de vírus, como influenza, herpes, citomegalovírus entre outros (Li *et al.*, 2012). Por outro lado, o poli I:C pode interagir com a proteína associada a diferenciação de melanoma (MDA-5), uma proteína citoplasmática que atua como um sensor que detecta o análogo de RNA viral quando penetra no citosol (Mccartney *et al.*, 2009). O gene 1 de indução do ácido retinóico (RIG-1) é uma outra classe de molécula, também citoplasmática, relacionada na ativação de IFN-  $\beta$  a partir de uma sinalização mediada por poli I:C (Dauletbaev *et al.*, 2015; Matsumiya; Stafforini, 2010). Independente da via de sinalização ativada, o poli I:C induz a maturação de DCs, aumentando a capacidade de resposta de células T específicas a algum antígeno (Kumar *et al.*, 2008).

Apesar das DCs serem as células do sistema imune que expressam TLR-3, esse receptor também é expresso em menores níveis em células NK, células T e macrófagos (Ammi *et al.*, 2015; Kabelitz, 2007). Contudo, é possível alterar-se a estrutura molecular da poli I:C, a fim de estimular uma determinada via de reconhecimento como no caso do Ampligen (poli (I:C<sub>12</sub>U)), uma variação da molécula que modula uma resposta imune unicamente por meio do TLR-3 (Jasani; Navabi; Adams, 2009). Em um estudo, Navabi, verificou que o Ampligen promove, *in vitro*, maturação da DCs e aumenta a capacidade de ativar células T citotóxicas, aumenta a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> e resposta Th1 quando comparado com DCs imaturas (Navabi *et al.*, 2009).

Estudos *in vivo* mostram um certo nível de toxicidade de poli I:C em mamíferos em tratamentos com doses cumulativas e de curto período entre uma dose e outra. Além disso, o poli I:C possui considerável toxicidade sistêmica, o que faz com que em tratamentos clínicos, seu uso seja voltado para aplicações locais (Dacoba *et al.*, 2020). Além da toxicidade, o uso sistêmico da substância pode induzir efeitos adversos como reações autoimunes (Sobel *et al.*, 1992). Por outro lado, variações do poli I:C, como o poli (I:C<sub>12</sub>U), também podem ser exploradas na redução de citotoxicidade e viabilizar mais os efeitos adjuvantes da substância (Martins; Bavari; Salazar, 2015; Robinson *et al.*, 1976). Desse modo, as aplicações do poli I:C devem ser bem elaboradas, uma vez que sozinho e em altas concentrações, a substância é tóxica e não induz tanta imunogenicidade, por outro lado, com um sistema de entrega adequado, pode ser uma

ótima estratégia terapêutica (Colapicchioni *et al.*, 2015).

O uso de poli I:C solúvel é alvo de degradação pelas ribonucleases presentes no soro e altas dosagens nessa forma de administração pode levar a efeitos colaterais como febre e anemia (Madrigano, 2008). Assim sendo, o uso de poli I:C como adjuvante pode ser associado com nano e micropartículas que podem aumentar a proteção do composto e de outra molécula de interesse de rápidas degradações, além de melhorar a absorção celular e direcionar um melhor alvo do sistema imune (Speth *et al.*, 2017). O fenômeno de permeabilidade e retenção aprimoradas (EPR) é comum em células tumorais, no qual o tecido afetado possui um aumento de permeabilidade e redução na renovação do líquido linfático (Colapicchioni *et al.*, 2015).

Assim sendo, o encapsulamento de poli I:C em NPs torna-se efetivo pois o princípio ativo do tratamento consegue chegar mais fácil no local do tumor e fica retido por mais tempo, além de que o potencial imunogênico das nanopartículas estimula uma maior imunogenicidade contra as células tumorais (Selvaraja; Gudipudi, 2019).

Diversas células tumorais expressam receptores TLR-3 funcionais, o que as tornam alvos para nanopartículas com poli I:C que, quando ligadas a molécula alvo, podem levar a redução da proliferação celular e apoptose (Smits *et al.*, 2007). A via de sinalização de morte celular pode ser induzida a partir de TLR-3, MDA-5 ou RIG-1 dependente ou não da ação de IFN (Paone *et al.*, 2008; Routhier *et al.*, 2010). O efeito adjuvante do poli I:C também já é descrito em vacina contra vírus. Em um estudo, Ichinohe, verificou eficiência do uso do dsRNA mimético como adjuvante na proteção contra o vírus influenza e proteção cruzada com outros tipos de vírus. O tratamento com o adjuvante levou a um aumento na produção de IgA e IgG sérico (Ichinohe *et al.*, 2005). O efeito estimulante adjuvante do poli I:C também demonstra ser eficiente em infecções causadas por bactérias. Ribes, verificou que o poli I:C promoveu um aumento da imunidade inata em camundongos imunocompetentes infectados desafiados com *Escherichia coli* sugerindo o uso da molécula como potencial candidato a treinamento da imunidade inata de indivíduos imunocomprometidos com alto risco de infecções (Ribes *et al.*, 2020). Em paralelo, há possibilidades na aplicação de vacinas de poli I:C para fins comerciais e econômicos. Em um estudo, Andresen, verificou um efeito positivo no tratamento de *Salmo salar*, importante na economia norueguesa, com formulações contendo poli I:C no tratamento de viroses, sendo que o agente adjuvante induziu um aumento na resposta imune inata do peixe (Andresen; Gjøen, 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAL

Verificar se a imunização pela via nasal com nanopartículas de albumina mimética a patógeno (NPPI) é capaz de induzir proteção contra a infecção pulmonar causada por *P. aeruginosa* em modelo *in vivo* murino.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) obter nanopartículas de albumina sérica bovina miméticas a patógenos contendo poli I:C e nanopartículas vazias;
- b) caracterizar fisicamente, quanto à morfologia, carga e tamanho, as nanopartículas produzidas;
- c) verificar se a imunização, pela via nasal de camundongos C57Bl/6, com antígenos totais de *P. aeruginosa* na presença das nanopartículas contendo ou não o poli I:C aumenta a produção de anticorpos e confere proteção contra a infecção por *P. aeruginosa*;
- d) realizar análise histopatológica e verificar danos teciduais em pulmões dos animais infectados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS VAZIAS E NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO POLINOSÍNICO:POLICITIDÍLICO (POLI I:C)

Para a síntese de Nanopartículas Vazias (NPV), 0,2 g de BSA foi dissolvido em 10 mL de água estéril deionizada (2% m/v), em sequência, a solução foi filtrada utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . A solução ficou sob agitação magnética por 30 minutos em temperatura ambiente. Na etapa de solvatação, foi adicionado um volume aproximado de 2 mL de álcool etílico absoluto gota a gota até a formação das nanopartículas. Após a formação das NPs, caracterizadas pela mudança de cor na solução (de transparente para opalescente) adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído a 25% e então as NPs foram deixadas por 2 horas em agitação magnética a temperatura ambiente a fim de realizar-se uma ligação cruzada entre as moléculas de BSA das nanopartículas. Para o processo de purificação, centrifugou-se a solução contendo as NPs por 15 minutos a 8600 força g por minuto a 25°C. Os sobrenadantes foram descartados e as nanopartículas foram ressuspendidas na concentração de 10 mg/mL. A síntese de NPPI seguiu os mesmos procedimentos com o diferencial de que na etapa inicial junto a solução de BSA, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de solução aquosa estéril contendo poli I:C na concentração de 5 mg/mL.

As NPs foram caracterizadas quando sua morfologia a partir de microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM – 6360LV) por meio de serviço terceirizado pelo centro de microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A partir da técnica de dispersão dinâmica de Luz (DLS) determinou-se diâmetro médio e índice de polidispersão, sendo verificado os valores de 261,7 nm e 0,29 para NPV e 497 nm e 0,38 para NPPI. O potencial Zeta de cargas elétricas foi obtido a partir de Laser Doppler sendo verificado um valor de -32 para NPV e -33,66 para NPPI. Todos estes parâmetros foram determinados a partir de um Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano SZ, Reino Unido) presente no Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos (LSLF) da UNIFAL-MG.

## 4.2 CRESCIMENTO DE *P. AERUGINOSA* E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A bactéria *P. aeruginosa*, isolado PA14 foi cedida pela professora doutora Regina Baldini do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Essa bactéria foi cultivada e armazenada a -80 °C até o momento do uso. Para cultivar o microrganismo, 1 mL de *P. aeruginosa* congelada em 20% de glicerol, foi inoculado em 50 mL de caldo LB e incubados em agitador horizontal a 180 rpm a 37 °C por 48 horas. A etapa de extração iniciou-se com centrifugação do meio de cultura com as bactérias a 2944 g por 15 minutos. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi colocado sob agitação magnética por 1 hora em temperatura ambiente com o tampão de lise (Guanidina 6 M pH 8,0) com 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). O lisado foi submetido a uma centrifugação por 30 minutos a 9800 g e o sobrenadante separado para a etapa de diálise. Para a realização da diálise, foi realizada uma nova centrifugação por 30 minutos a 9800 g em um tubo com coluna de diálise Amicon® Ultra-15 com poros de 15 kDa. Ao volume retido na câmara interna após a centrifugação, adicionou-se 10 ml de solução salina tamponada (PBS) ao tubo e repetiu-se a centrifugação a fim de se substituir o tampão das proteínas. Ao término desta etapa, foi feita a adição de 2 ml de PBS contendo 0,5 mM de PMSF, e o volume de proteínas em micro-tubos e congelou-se o material a -20 °C. A quantidade de proteínas foi quantificada pelo método do ácido bicinconínico (BCA).

## 4.3 VERIFICAÇÃO DE EFEITO CORONA NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS

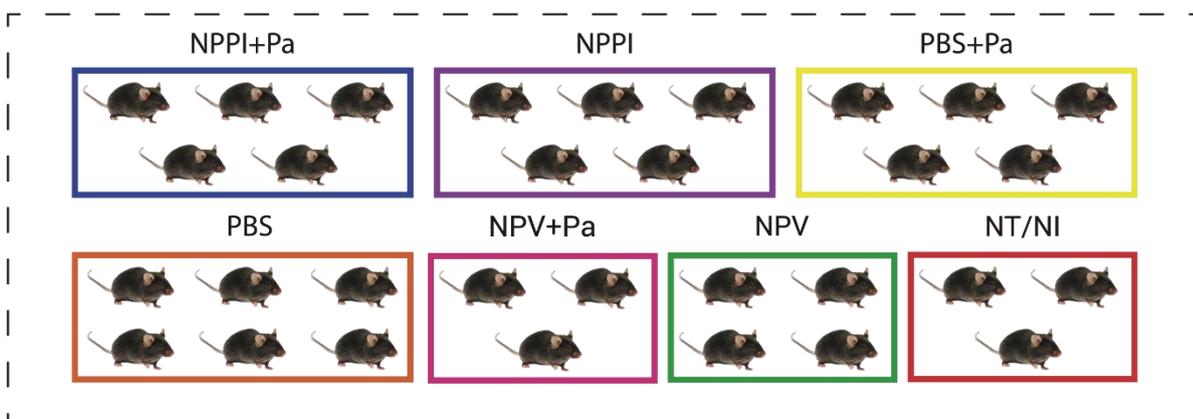
A fim de se verificar se as proteínas totais de PA14 aderiram a superfície das nanopartículas, 1 ml da solução contendo as NPs (10 mg) foi centrifugada a 8600g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as proteínas ressuspensas em 1 mL de tampão PBS. Em um tubo de 1,5 ml misturou-se 60 µL de NPPI [10 mg/mL] e 20 µL de proteínas totais de *P. aeruginosa* [3,6 mg/mL]. Como controle misturou-se em um novo tubo 60 µL de PBS e mais 20 µL de proteínas totais. Em seguida, os tubos foram levados para incubação por 5 minutos e então centrifugados a 8600g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para quantificação de proteínas por meio do método do ácido bicinconínico (BCA). O procedimento foi realizado em triplicatas independentes.

#### 4.4 ENSAIO DE IMUNIZAÇÃO ANIMAL

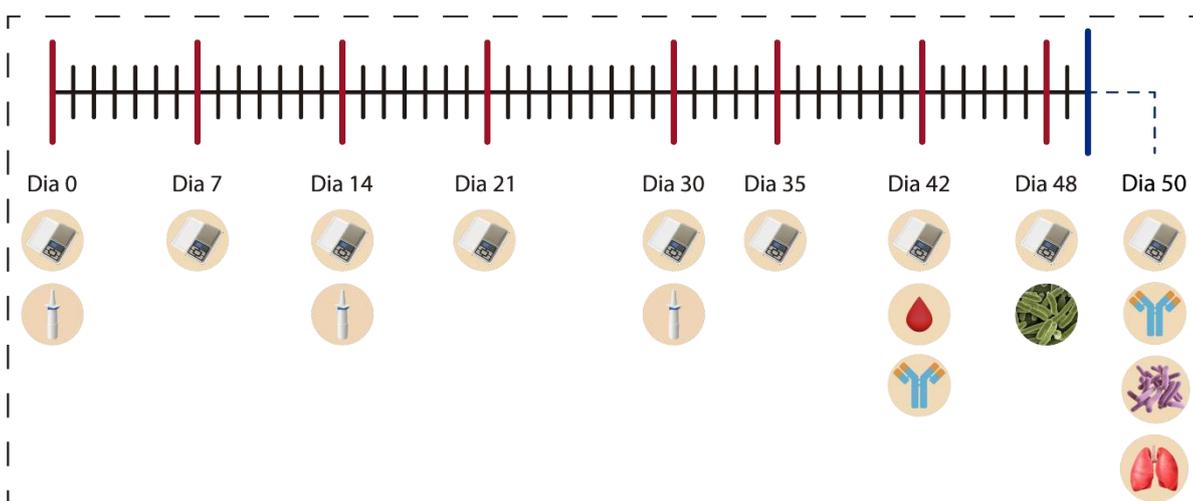
A partir da aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (protocolo Nº: 0034/2021), 31 camundongos fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas de idade foram mantidos com livre acesso a ração, água e temperatura adequada. Os animais foram divididos em grupos de forma aleatória e imunizados por via nasal nos dias 0, 14 e 30 com 10 µL por narina contendo 100 µg de NPs com Poli I:C mais 50 µg de antígenos de *P. aeruginosa* (NPPI+Pa; n=5) ou com 100 µg de NPs vazias mais 50 µg de antígenos de *P. aeruginosa* (NPV+Pa; n=3). Os grupos controles foram tratados com solução salina tamponada (PBS; n=6), 100 µg de NPs com Poli I:C (NPPI; n=5), 50 µg de proteínas totais de PA 14 (PBS+Pa; n=5), 100 µg de NPV (NPV; n=4) ou não passaram por intervenção (NT/NI; n=3). Durante o período de imunização, os animais foram pesados semanalmente. No 12<sup>o</sup> dia após a última dose do imunizante, retirou-se sangue dos animais (máximo de 500 µl) a partir da veia submandibular. O material biológico foi mantido a 4 °C para coagulação do sangue e depois centrifugado a 1100g durante 10 minutos para a separação do soro. Esse foi coletado e congelado a -20 °C para a avaliação de produção de anticorpos específicos para as proteínas totais de *P. aeruginosa*. Para a imunização e retirada do sangue os animais foram anestesiados com 50 µL da solução contendo Cetamina (60 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) diluídos em PBS (Agener União, Brasil) por meio da via intraperitoneal. O delineamento geral do experimento está representado na Figura 6.

Figura 6 - Delineamento experimental da imunização animal.

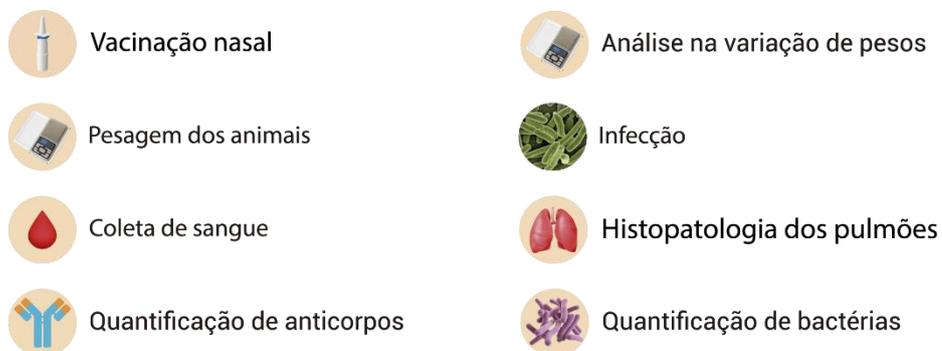
## Delineamento dos grupos tratados



## Linha do tempo



## Legenda



Fonte: O autor (2024).

#### 4.5 DESAFIO DOS ANIMAIS COM CEPA 14 DE *P. AERUGINOSA*

Duas semanas após a última imunização, os animais foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo a partir de solução salina PBS contendo Cetamina (60 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) via intraperitoneal. Em sequência, os animais dos grupos PBS, PBS+Pa, NPPI, NPPI+Pa, PBS e PBS+Pa foram desafiados com uma carga bacteriana de 10 µL da bactéria em meio LB em cada narina (10<sup>7</sup> UFC/animal) de uma cultura de *P. aeruginosa* crescida por 48 horas (4 x 10<sup>9</sup> 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). Os animais foram pesados e analisados diariamente em relação a mortalidade em um período máximo de 48 horas pós infecção, sendo verificado morte dos animais a partir de 24 horas. Decorrido o tempo, os indivíduos remanescentes foram eutanasiados com dose letal de solução anestésica contendo 300 mg/Kg de cetamina e 30 mg/Kg de xilazina via intraperitoneal (Favoretto; Di; Olivato, 2019). Ao término da infecção, todos os animais foram processados em fluxo e tiveram seus pulmões direitos e macerados em fluxo com pilões estéreis em 500 µL de PBS para quantificação de UFC. Os pulmões esquerdos foram utilizados para análise histopatológica, sendo conservados em solução de formaldeído 10% por 48 horas e transferidos, em seguida, para álcool 70% até o devido processamento.

#### 4.6 ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI PROTEÍNAS TOTAIS DE *P. AERUGINOSA*

Para a realização do ELISA, utilizou-se as amostras de soro individuais dos 31 animais para a busca de anticorpos IgG contra as proteínas de *P. aeruginosa*. Inicialmente, sensibilizou-se uma placa de 96 poços Nunc® 96 Deep Well (Termo Fischer, USA) adicionando 100 µL por poço de solução contendo 20µg/mL das proteínas totais de *P. aeruginosa* diluída em tampão carbonato/bicarbonato (0,1M pH 9,6). A placa foi incubada por 16-24 horas em uma temperatura constante de 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e em seguida fez o bloqueio da placa adicionando-se 200 µL por poço de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) diluído em PBS-T. A placa foi

incubada por mais 2 horas a 37°C. Em sequência, a placa foi lavada mais cinco vezes com a solução de PBS-T para completa remoção do resíduo de bloqueio e então foi adicionado 100 µL por poço dos soros dos animais diluídos na proporção de 1:50. A placa foi levada para incubação por mais 1 hora a 37°C e então lavou-se mais três vezes com a solução de lavagem. Na etapa seguinte foram adicionados 100 µL por poço de anticorpos anti-IgG de camundongos conjugado com peroxidase (SigmaAldrich, EUA) diluído em PBS-T em uma concentração de 1:5000 e então incubou-se a placa por mais 1 hora a 37 °C. Após mais três lavagens com PBS-T, adicionou-se 100 µL por poço de uma solução de Tetrametilbenzidina - TMB (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e deixou a placa descansando por 15 minutos em temperatura ambiente e protegido de luz. Em seguida, interrompeu-se a reação adicionando 30 µL por poço de ácido sulfúrico 2M e a placa foi levada para leitura da densidade ótica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa AnthosZenyth 200rt) em comprimento de onda de 450 nm. Para análise da leitura, levou-se em conta o ponto de corte (cut-off) que foi calculado através da média da densidade ótica obtida nos animais do grupo controle (imunizados somente com PBS) somada a duas vezes o valor do desvio padrão obtido para este grupo. O protocolo foi repetido para busca de anticorpos anti-IgM e anti-IgA seguindo as mesmas condições e adequando-se com os respectivos anticorpos na mesma concentração de 1:5000.

#### 4.7 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS IGG ANTI PROTEÍNAS TOTAIS DE *P. AERUGINOSA*

A titulação de anticorpos IgG para as proteínas totais de *P. aeruginosa* seguiu os mesmos passos para sensibilização, bloqueio, incubação e lavagem do ELISA para a detecção dos anticorpos descritos no item 4.7. Na etapa de adição das amostras de soro, foi realizado uma mistura de soros dos animais de cada grupo e em sequência, foram adicionados 200 µL das amostras na primeira linha da placa na diluição de 1:50. Nas demais linhas foram adicionados 100 µL de tampão PBS-T. A fim de aumentar a diluição dos anticorpos nas amostras, sucedeu-se com uma diluição seriada transferindo-se e misturando 100 µL das amostras da primeira linha da placa para as subsequentes até a última, no qual após a mistura, descartou 100 µL da solução. As etapas seguintes também respeitaram o protocolo de ELISA para identificação de IgG.

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA NOS PULMÕES DE ANIMAIS INFECTADOS POR *P. AERUGINOSA*

Os pulmões direitos foram coletados, pesados e homogeneizados em PBS conforme descrito no item 4.6. Após a homogeneização, foram realizadas diluições seriadas das suspensões (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>) e 50 µL de cada diluição foram plaqueadas 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 determinação de UFC/mg de tecido.

#### 4.9 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IGG EM TECIDOS PULMONARES DE ANIMAIS INFECTADOS COM *P. AERUGINOSA*

As amostras de pulmão maceradas conforme descrito no item 4.6 foram descongeladas e centrifugadas a 1100g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram diluídos 10X em PBS-T e o protocolo de sensibilização e bloqueio da placa de 96 poços procedeu igual ao descrito no item 4.7. Como controle positivo desse ELISA, utilizou-se um macerado de pulmões de animais não infectados e não imunizados em que foi propositalmente adicionado com anticorpos IgG anti-*Pseudomonas*.

#### 4.10 HISTOPATOLOGIA

Os pulmões esquerdos dos camundongos foram extraídos em fluxo laminar e fixados em temperatura ambiente, utilizando-se uma solução de formaldeído 10% diluído em PBS. Em sequência, os órgãos foram desidratados e diafanizados gradualmente em soluções crescentes de etanol e xilol e incluídos em parafina histológica. A etapa de secção dos tecidos foi realizada em micrótomo rotativo no qual obteve-se cortes sagitais de 5 µm de espessura. Posteriormente, foi realizado o processo de coloração do material pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes histológicos foram examinados em microscópio óptico AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemanha). Cada lâmina histológica foi fotografada e analisada, sendo escolhido uma foto representativa de cada grupo para a montagem de um painel ilustrativo.

#### 4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism® 8.0. Foi utilizado análise de variância (ANOVA), seguido de uns pós-teste de Tukey. A análise estatística da curva de mortalidade (curva de Kaplan Meier) foi realizada utilizando o teste de Teste de Log-rank (Mantel-cox). O nível mínimo de significância aceito foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

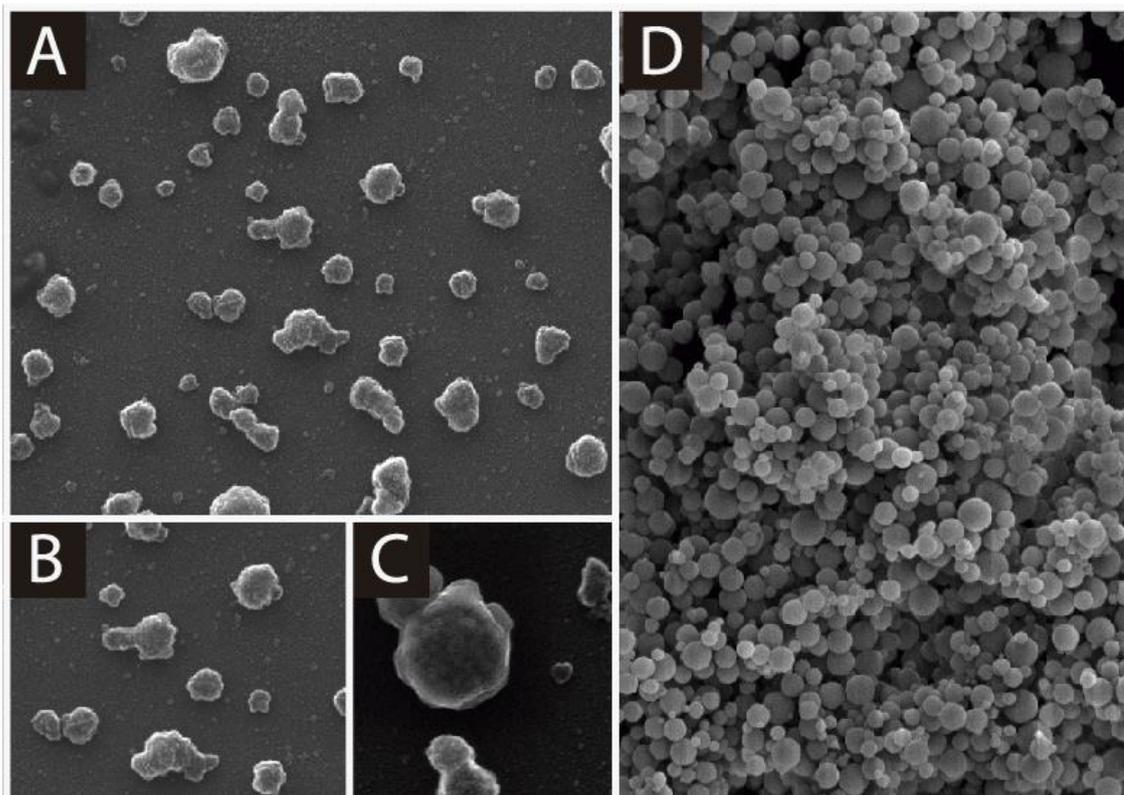
A caracterização das NPs pode ser realizada a partir de diferentes técnicas a fim de se compreender todos os aspectos morfológicos, físicos e químicos das NPs. Tal etapa é essencial para se delinear um sistema de aplicação e compreender as interações entre as NPs e os sistemas alvo. Desse modo, a morfologia das NPs, por sua vez, obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura são representadas pela Figura 7. Na imagem é possível ver que as NPPI (A, B e C) possuem uma superfície rugosa e irregular, enquanto que as NPV (D) são mais regulares e apresentam superfície mais lisa. As nanopartículas possuem tamanhos relativamente uniformes sem uma variação muito discrepante entre as dimensões. A partir da técnica de DLS, foi possível verificar que as NPPI apresentam um diâmetro médio de  $497 \pm 140.4$  nm e índice de polidispersão de  $0,38 \pm 0,06$ . Quanto ao potencial de cargas elétricas, o valor médio obtido foi de  $-33.66 \pm 3.93$  mV. As nanopartículas vazias, por sua vez, apresentaram diâmetro médio de  $261.7 \pm 17.25$ , índice de polidispersão de  $0.2864 \pm 0.080$  e potencial elétrico de  $-32$  mV. É possível verificar que a maior diferença entre as formulações se deve pelo seu diâmetro médio uma vez que NPPI possui, aproximadamente, o dobro de tamanho da NPV, enquanto que as demais propriedades são muito próximas. As respectivas informações são organizadas e resumidas no Quadro 1.

Tabela 1–Diâmetro médio, potencial Zeta e índice de polidispersão das nanopartículas (NPs) de albumina sérica bovina (BSA) contendo ácido polinosínico-policiridílico (poli I:C) e NP vazias (NPV).

Tipo de NP	Diâmetro médio	Potencial zeta (mV)	Índice de polidispersão
NPV	$261.7 \pm 17.25$	-32	$0.29 \pm 0.08$
NPPI	$497 \pm 140.4$	-33.66	$0,38 \pm 0,06$

Fonte: Autor (2024).

Figura 7 - Caracterização morfológica das nanopartículas de BSA do tipo NPPI e NPV em microscopia eletrônica de varredura.

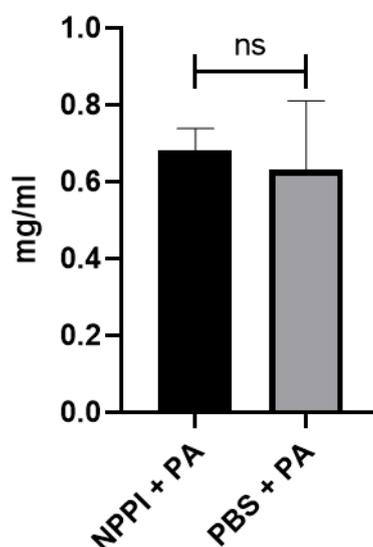


Fonte: Autor (2024)

Legenda: A imagem contém 4 campos de microscopia eletrônica de varredura das NPs (A, B, C e D) elaboradas por contratação de serviço do Centro de microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Em **A** observam-se as nanopartículas em um aumento de 50.000x, com um maior campo de visão; em **B** mostra-se um recorte do campo **A** em aumento de 1000.000x e em **C** foi aplicado um aumento de 1.000.000x, o que reduziu o campo de visão, mas trouxe um maior detalhamento da superfície das NPPIs. Por outro lado, no campo **D** é possível verificar a superfície das NPVs, que estão em maior quantidade na amostra e em aumento de 4.000x.

O experimento de adesão das proteínas (Figura 8) mostrou que as proteínas de *P. aeruginosa* não apresentaram nível significativo de adesão na superfície das NPPIs. O nível de proteínas presente na média das triplicatas do grupo NPPI+Pa foi de 0,6833 mg/ml enquanto que em PBS+Pa a concentração foi de 0,63 mg/ml. Os valores não possuem variação estatística entre si indicando que em NPPI+Pa as proteínas totais de *P. aeruginosa* adicionadas não se aderiram as NPs e ficaram concentradas no sobrenadante.

Figura 8 - Teste de adesão de proteínas de *P. aeruginosa* em superfície de nanopartículas.



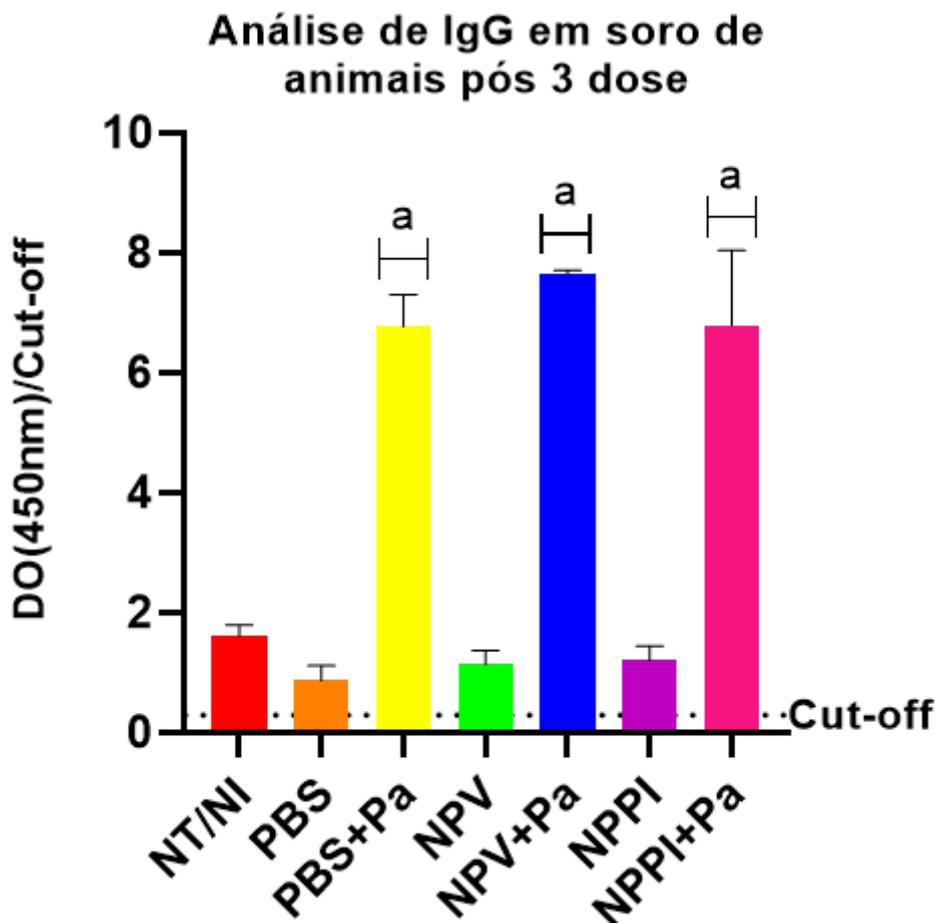
Fonte: Autor (2024).

Legenda: Os valores obtidos são as médias de triplicatas independentes. Não houve variação significativa entre os grupos analisados pois não houve interação significativa entre as proteínas de *P. aeruginosa* e a superfície das NPs e as médias são, estatisticamente, iguais.

ns = não significativo.

Os ensaios de imunização (**Figura 9**) demonstraram que há uma produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa* mais significativa nos animais dos grupos PBS+Pa, NPV+Pa e NPPI+Pa, ou seja, que receberam algum tratamento com associação das proteínas das bactérias. Além disso, os animais destes grupos não apresentaram variações estatísticas entre si ao mesmo tempo que demonstram ser diferentes de todos os outros grupos controles (PBS PBS, NPV e NPPI). Esses não apresentaram quantidades significativas de anticorpos uma vez que não possuem variações significativas em relação aos animais não imunizados.

Figura 9 - Produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* em grupos de animais tratados com 3 doses de imunizantes via nasal com as diferentes formulações.



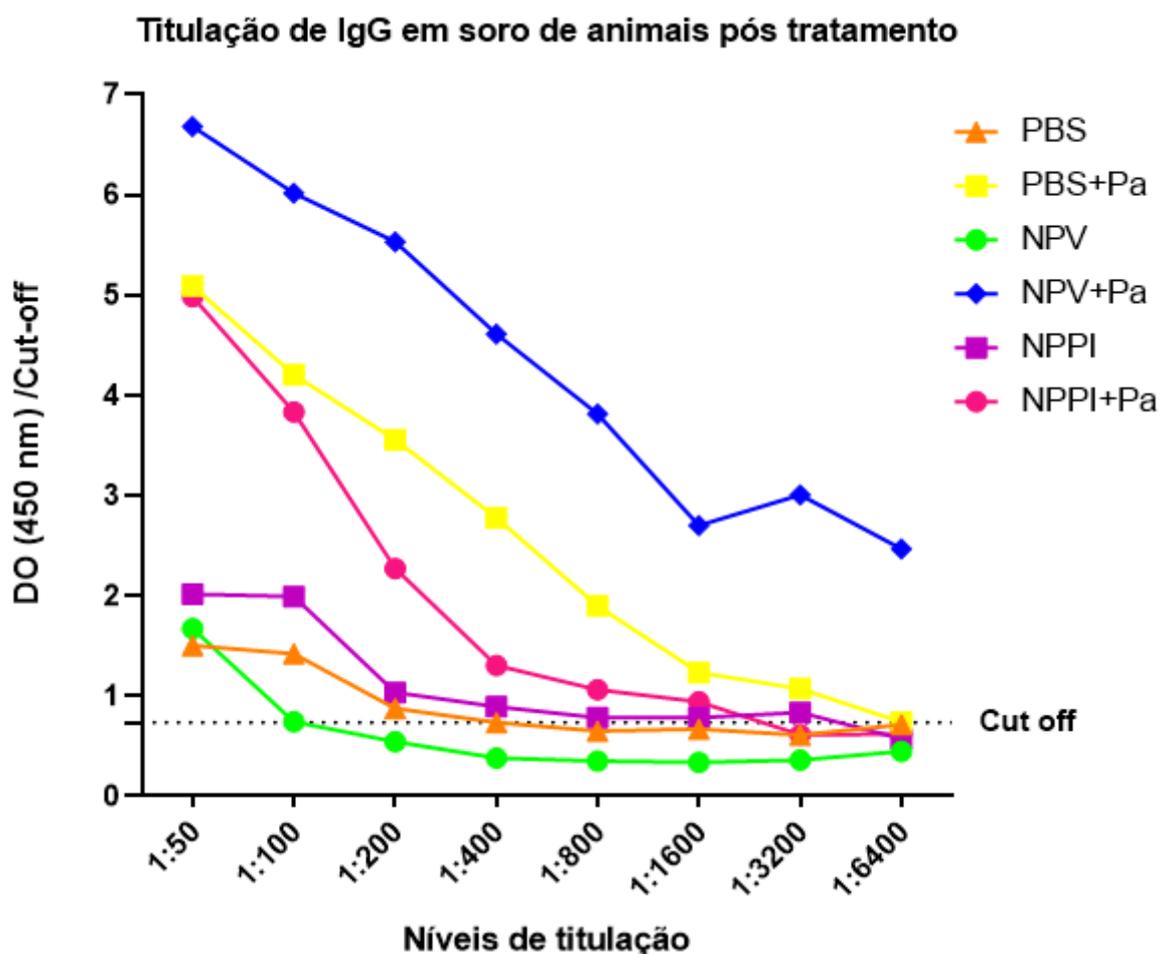
Fonte: Autor (2024).

Legenda: (one-way ANOVA). "a" indica que o grupo em questão apresenta diferença estatística com os grupos NT/NI (n=3), PBS (n=6), NPV (n=4) e NPPI (n=5), todos com um valor de  $p < 0,0001$ . Os grupos PBS+Pa (n=5), NPV+Pa (n=3) e NPPI+Pa (n=5) são, estatisticamente, iguais. Estes 3 grupos apresentaram um valor estatístico de  $p < 0,0001$  em relação a todos os demais.

Além da quantificação de anticorpos IgG no soro dos animais, foi realizada uma busca por anticorpos IgM e IgA anti-*P. aeruginosa* e os resultados indicam que esses não foram detectados em nenhum dos grupos testados (dados não mostrados). Dessa forma, procede-se, apenas com a titulação de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* (Figura 10). A partir do valor de *cut-off* (0,74) mensurou-se de o título de anticorpos em cada grupo, que foram os seguintes NPV (1:200), PBS (1:1600), NPPI+Pa (1:1600), NPPI (1:3200), PBS+Pa (1:6400) e NPV+Pa ( $\geq 1:6400$ ). Os animais dos

grupos NPV (1:200), PBS (1:1600) e NPPI+Pa (1:1600) apresentaram títulos mais baixos de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*.

Figura 10 - Titulação dos anticorpos IgG anti *P. aeruginosa* encontrados em soros de animais tratados com 3 doses de imunizantes via nasal com as diferentes formulações.



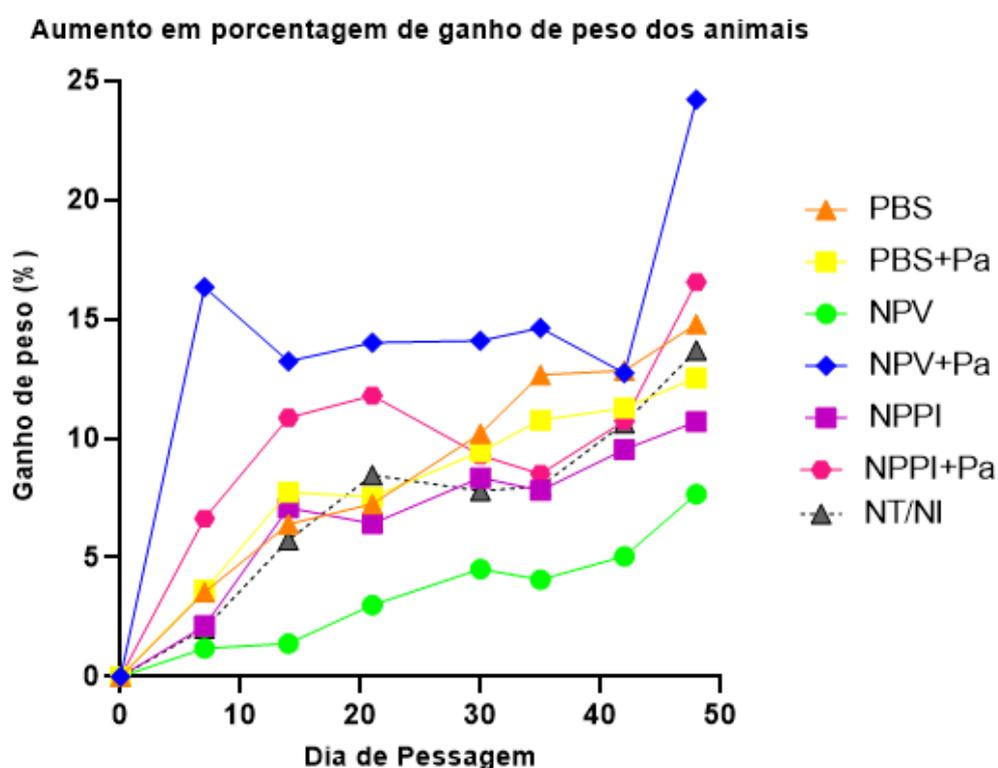
Fonte: Autor (2024).

Legenda: Os títulos de cada diluição correspondem a média de duplicatas do pool de amostras dos animais de cada grupo. A titulação segue uma diluição seriada iniciando-se em 1:50 e decrescendo proporcionalmente até 1:6400 seguindo uma razão. A linha pontilhada representa a linha de corte do respectivo experimento.

Com o objetivo de verificar se os tratamentos causariam interferência no ganho de peso dos animais ao longo dos dias, foi feita a pesagem dos animais durante os dias de imunização (**Figura 11**). Ao total foram realizadas 8 pesagens ao longo das 3 doses de imunizantes, sendo que o dia 0 coincidiu com a 1 dose do tratamento. Ao longo das pesagens, verificou-se que todos os animais apresentaram tendência no ganho de

peso, mesmo que em diferentes proporções. No grupo NPV, o aumento dos pesos foi menos expressivo adquirindo uma média máxima de 7,65% em relação às pesagens iniciais. Paralelamente, os animais com maior variação no aumento de pesos foram os animais do grupo NPV+Pa, com média máxima de 24,20% em relação ao início das pesagens. Os demais grupos flutuam entre este intervalo.

Figura 11 - Aumento, em porcentagem, do ganho de pesos dos animais imunizados e não imunizados ao longo dos dias.



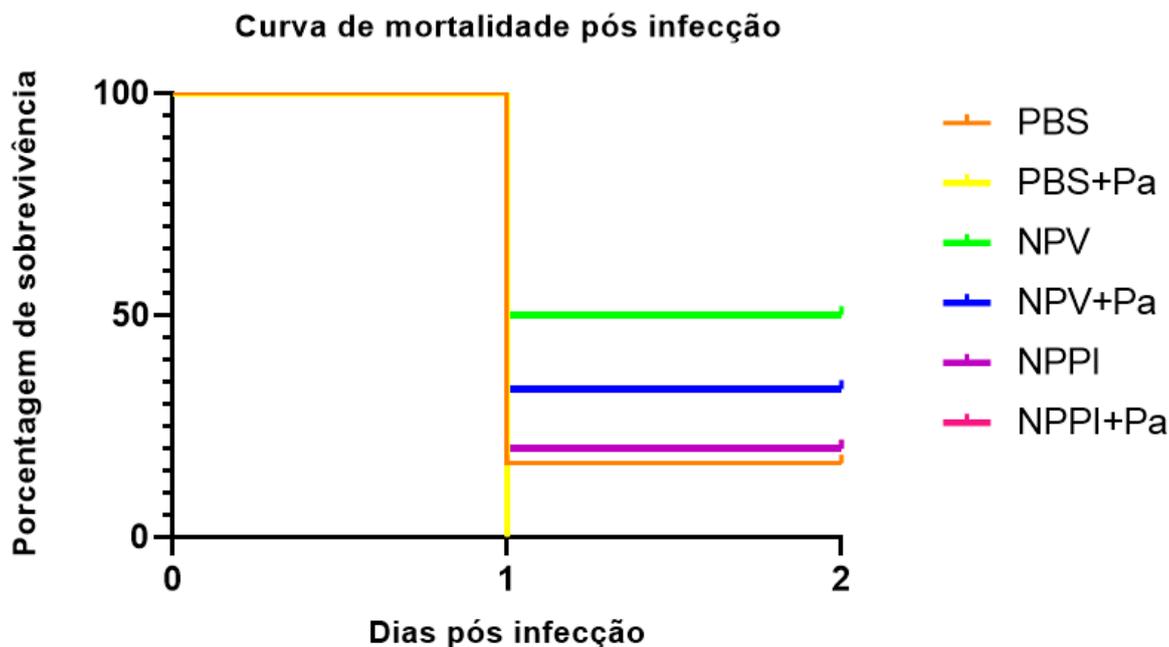
Fonte: Autor (2024).

Legenda: Cada ponto do gráfico corresponde à média dos animais presentes em cada grupo em um período de pesagem. Os grupos contam com respectivos números de animais: PBS, n=6; PBS+Pa, n=5; NPV, n=4; NPV+Pa, n=3; NPPI, n=5 e NPPI+Pa, n=5.

A fim de visualizar os efeitos protetivos da imunização, acompanhou-se diariamente por um intervalo de 48 horas a sobrevivência dos animais desafiados com *P. aeruginosa* (Figura 12). Nas primeiras 24 horas, foi verificado que a maioria dos animais, em todos os grupos analisados, morreram após a infecção. Foi possível notar uma baixa taxa de sobrevivência em todos os grupos, sendo elas: PBS+Pa (0%), PBS

(16,6%), NPPI e NPPI+Pa (20%), NPV+Pa (33,3%) e NPV (50)%. Não houve valores significativos nas estatísticas de sobrevivência dos grupos analisados.

Figura 12 - Curva de sobrevivência dos animais desafiados com *P. aeruginosa*.

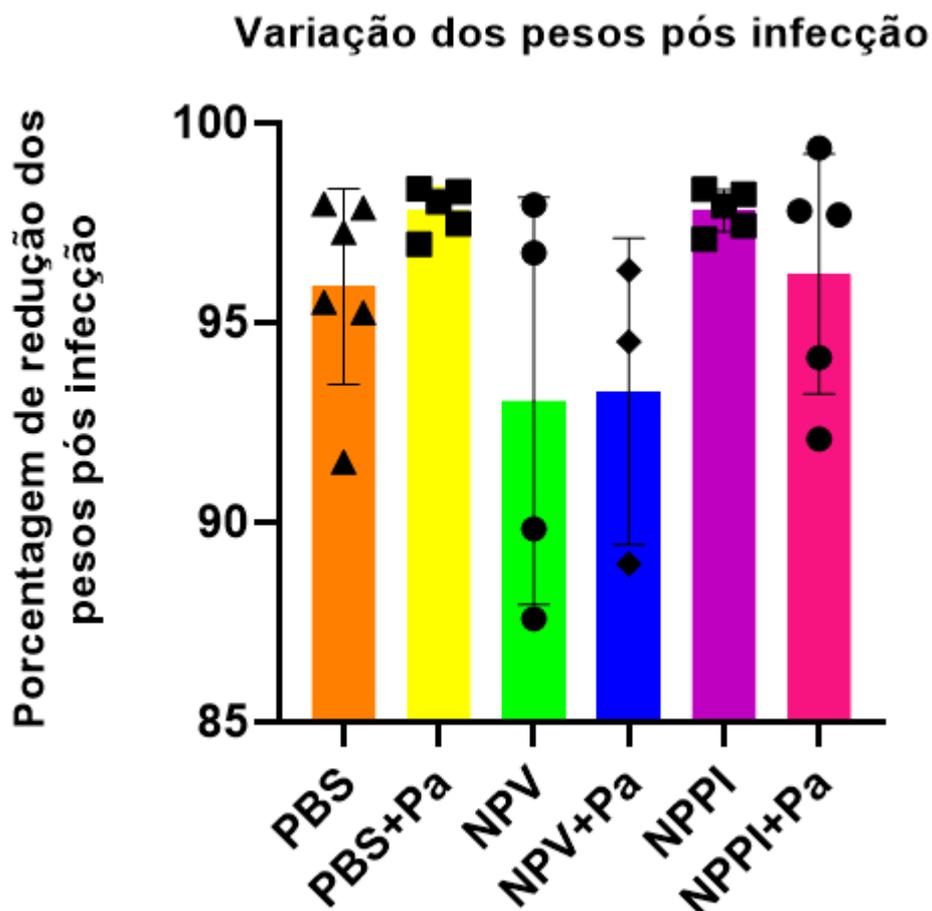


Fonte: Autor (2024).

Legenda: A infecção por *P. aeruginosa* foi realizada pela via nasal ( $10^7$  UFC/mL) assim como os tratamentos, seguindo a relação dos grupos: somente PBS (n=6), PBS+Pa (n=5), NPPI (n=5), NPPI+Pa (n=5), NPV (n=4) e NPV+Pa (n=3).

Com o objetivo de mensurar a alteração de pesos dos animais pós-infecção, foi feito um comparativo, em porcentagem, entre os pesos individuais de cada animal antes do desafio por *P. aeruginosa* e no dia da morte/eutanásia do animal (Figura 13). Como é possível verificar no gráfico, todos os animais de todos os grupos apresentaram uma redução de pesos. Na questão da distribuição dos pesos, os grupos PBS+Pa e NPPI apresentaram menor dispersão dos dados enquanto que os demais grupos apresentaram maiores variações entre os animais. Contudo, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Figura 13 - Variação em percentagem nos pesos dos animais desafiados com *P. aeruginosa* ao longo de 2 dias.

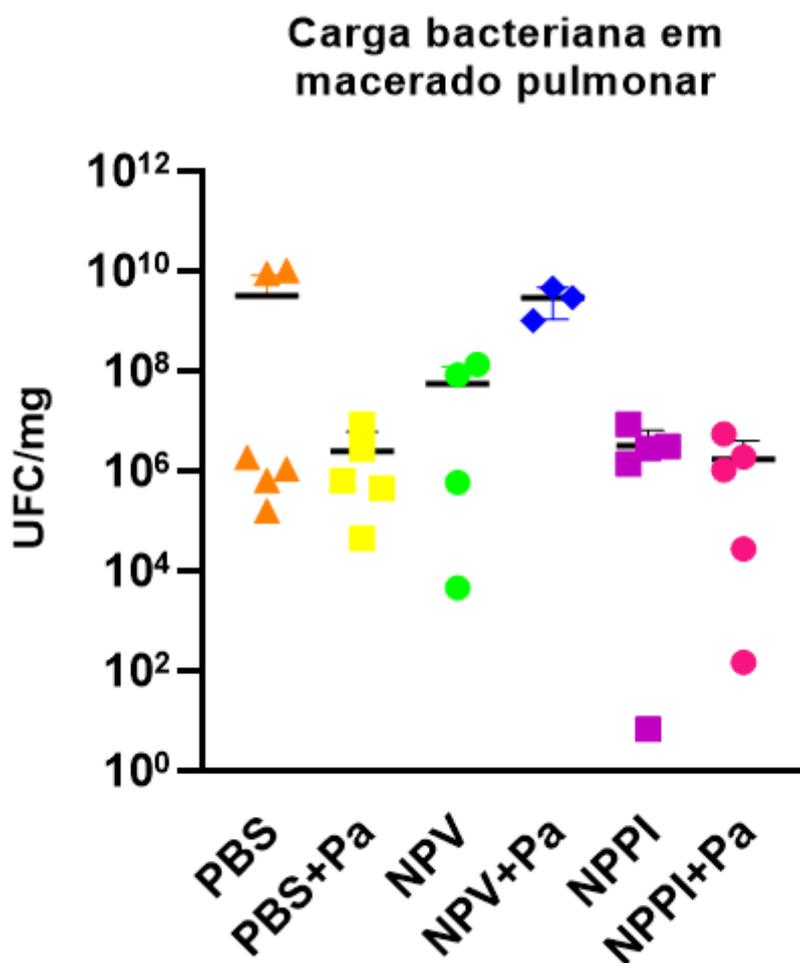


Fonte: Autor (2024).

Legenda: Cada ponto do gráfico corresponde a um animal no qual comparou-se o peso antes do desafio e no momento da morte/eutanásia. As médias de perda de peso dos animais por grupo são: PBS+Pa = 4,35%; NPPI = 4,38%; NPPI+Pa = 7,55; PBS = 8,19%; NPV+Pa = 13,45% e NPV = 13,92%.

A quantificação de carga bacteriana foi realizada a fim de verificar se o tratamento influencia na eliminação das bactérias no pulmão. Apesar de haver alguns animais com valores de UFC/mg que aumentam a dispersão dos grupos, as médias de cada tratamento não demonstram variações significativas entre si. As respectivas médias, em ordem crescente, de carga bacteriana foram: NPPI+Pa =  $1,71 \times 10^6$  UFC/mg; PBS+Pa =  $2,5 \times 10^6$  UFC/mg; NPPI =  $3,19 \times 10^6$  UFC/mg; NPV =  $5,51 \times 10^7$  UFC/mg; NPV+Pa =  $2,89 \times 10^9$  UFC/mg e PBS =  $3,23 \times 10^9$  UFC/mg. Os dados são apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Unidades Formadoras de Colônia/mg (UFC) em tecido pulmonar de animais desafiados por *P. aeruginosa*.

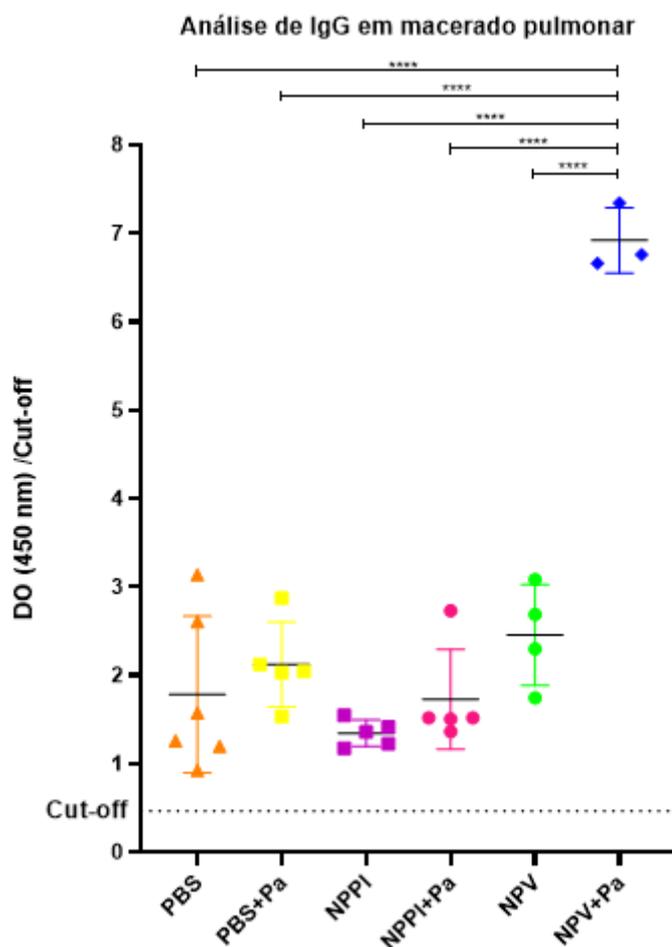


Fonte: Autor (2024).

Legenda: Cada ponto do gráfico é correspondente a um animal e devido ao crescimento exponencial das bactérias, a escala de UFC/mg é representada em ordem logarítmica.

Os pulmões dos animais processados também foram utilizados para quantificação de anticorpos IgG, IgM e IgA anti- *P. aeruginosa*, sendo detectado apenas IgG (Figura 15). Neste experimento foi verificado que NPV+Pa foi o único grupo com uma expressão significativa de anticorpos IgG anti- *P. aeruginosa* apresentando uma diferença estatística com os demais grupos. Tal como verificado na Figura 9 e na Figura 10, existe uma tendência para que grupos imunizados com as proteínas de *P. aeruginosa* pura ou com alguma associação expressem uma maior quantidade de anticorpos em relação aos demais tratamentos. Em todas as variações estatísticas, foi verificado um valor de  $p < 0,0001$ .

Figura 15 - Quantificação de anticorpos IgG em macerado pulmonar de animais desafiados com *P. aeruginosa*.



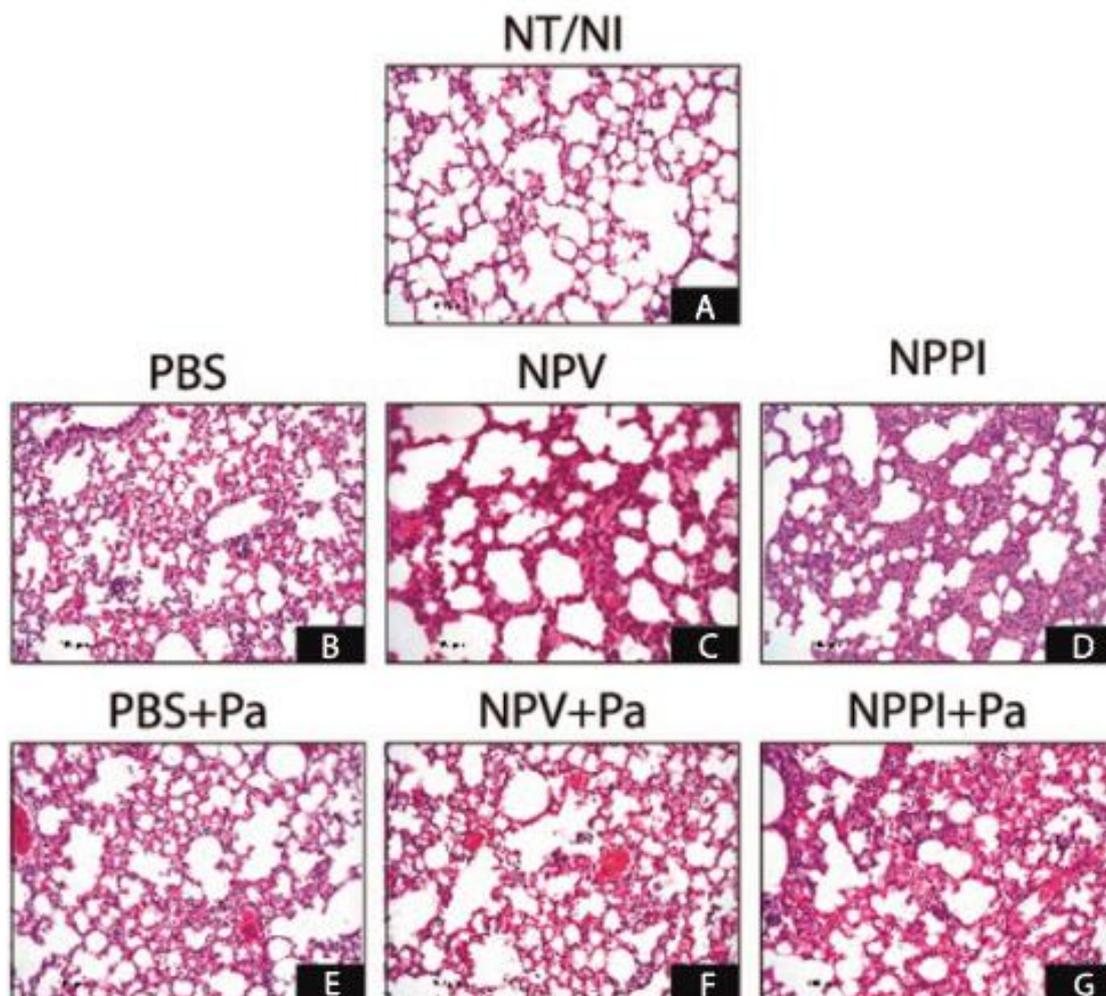
Fonte: Autor (2024).

Legenda: (one-way ANOVA). (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Cada ponto do gráfico corresponde a quantidade de anticorpos IgG presente no macerado pulmonar de um animal. Os grupos são delineados de acordo com os demais experimentos: PBS; n=6, PBS+Pa; n=5, NPPI; n=5 e NPPI+Pa; n=5, NPV; n=4, NPV+Pa; n=3.

Os pulmões também foram utilizados para análise histopatológica, representada por meio da Figura 16. As lâminas, representadas por A, B, C, D, E, F e G apresentaram alvéolos mais espessos, presença de células inflamatórias, pontos de hemorragia e vasos congestionados. A presença de edema, por sua vez, foi o elemento menos verificado em todos os grupos.

Figura 16 - Análise histopatológica dos pulmões.



Fonte: Autor (2024).

Legenda: A figura é dividida pela exibição dos gráficos sendo eles Injúria Pulmonar (1-A) e Arquitetura Pulmonar (2-B). As lâminas representativas dos grupos são mostradas em: NT/NI (2-A), PBS (2-B), NPV (2-C), NPPI (3-D), PBS+Pa (2-E), NPV+Pa (2-F) e NPPI+Pa (2-G).

## 6 DISCUSSÃO

As NPs sintetizadas possuem uma morfologia esférica e rugosa, como demonstrado a partir da análise por microscopia de varredura (Figura 5). Essa morfologia é similar com as morfologias de nanopartículas de BSA de outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa e por outros estudos (Morais *et al.*, 2018; Prajapati; Garrido; Somoza, 2021).

Além da morfologia, determinar as dimensões, cargas elétricas e índices de polidispersão são essenciais na caracterização das NPs (Alkie *et al.*, 2019). Em relação ao diâmetro, as NPs contendo poli I:C apresentaram uma média de  $497 \pm 140.4$  nm, enquanto que as NPV possuem dimensões consideravelmente menores em torno de  $261.7 \pm 17.25$ . Apesar da discrepância entre os tamanhos das NPs, as formulações ainda estão de acordo com os valores obtidos em outros trabalhos do grupo de pesquisa (Morais *et al.*, 2018).

O diâmetro das NPs pode apresentar variações por conta de fatores como pH, concentração de proteínas, a técnica empregada para a síntese entre outros. Em seus estudos, Paik, a partir do método de solvatação/coacervação por etanol, verificou que ao alterar o pH da solução de suspensão do BSA o tamanho das NPs também é alterado. Em pH 9, as NPs apresentaram tamanho médio de 100 nm quando o etanol era adicionado de modo intermitente e que o tamanho variava entre 200-400 nm quando o etanol era adicionado de modo contínuo. Em pH 6, a adição intermitente levou a NPs com 250 nm de diâmetro e adição contínua levou a dimensões de 300 nm (Paik *et al.*, 2013). Srivastana e Prajapati, por sua vez, ao compararem as variáveis que influenciam nos tamanhos das NPs, trazem um compilado de outros trabalhos que apontam um espectro de variação entre 100 a 300 nm (Srivastava; Prajapati, 2020). No caso das formulações NPPI e NPV, as alterações podem estar relacionadas à adição do Poli I:C na composição pois toda a metodologia seguiu um mesmo protocolo.

As dimensões das NPs implicam em como estes sistemas serão processados e recebidos como sistemas de entrega pelo sistema imunológico inato. NPs de diâmetro médio em torno de 20-200 nm possuem dimensões suficientes para serem processadas por células dendríticas residentes nos linfonodos a partir do processo de endocitose por via da clatrina e/ou caveolina. Por outro lado, NPs de dimensões entre 500-1000 nm podem ser digeridas por células dendríticas migratórias a partir de

fagocitose e/ou micropinocitose. Independente do processo de processamento das NPs, uma das grandes dificuldades do delineamento dos sistemas de entrega é mantê-los acumulados nos tecidos por tempo suficiente para indução de resposta imunológica e não serem removidos tão rapidamente pelo sistema sanguíneo (Priyanka *et al.*, 2023).

A carga superficial das NPs, por sua vez, é calculada a partir do valor zeta e para valores de  $\pm 30$  mV as nanopartículas demonstram estabilidade e evitam agregamento entre si (Raj *et al.*, 2015). Assim sendo, com um valor -33.66 mV para as NPPI e -32 mV para NPV, verifica-se que ambas as formulações apresentam um potencial zeta aceitável. Quanto ao PDI, este parâmetro mensura a heterogeneidade do sistema com base no tamanho das NPs. Segundo a ISO, valores de PDI  $<0,05$  são mais comuns em monodispersões e para valores  $>0,7$  o sistema já apresenta bastante heterogeneidade nos tamanhos das NPs (Mudalige *et al.*, 2018). Assim sendo, as NPPI podem ser caracterizadas com dimensões homogêneas, uma vez que apresenta  $0,38 \pm 0,06$  de PDI e o mesmo é válido para NPV, que possuem valores semelhantes próximos a  $0,29 \pm 0,08$  de PDI. Portanto, do ponto de vista físico-químico (Tabela 1), as NPs do respectivo trabalho possuem características coerentes com os dados descritos na literatura.

As NPs podem interagir com proteínas presentes no meio em que elas estão e, portanto, apresentar as coroas de proteína. Essas são camadas proteicas que revestem a superfície das nanopartículas. Esta camada extra pode ser explorada na nanomedicina, uma vez que a coroa de proteína pode ser utilizada para diagnóstico de doenças, aumento da internalização celular ou melhorar a biodistribuição das substâncias o qual estão carregando (Mahmoudi *et al.*, 2023). Como o objetivo do trabalho foi verificar a imunização de animais a partir de diferentes formulações de NPs com ou sem antígenos associados, é necessário avaliar se existe alguma ligação das proteínas totais de *P. aeruginosa* na superfície das NPPI. Ao avaliar-se a adesão das proteínas totais de *P. aeruginosa* na superfície das NPs (Figura 4) é possível ver que não houve a formação de uma coroa de proteínas, uma vez que a quantificação indireta das proteínas indica que não houve ligação à superfície das nanopartículas.

Após as análises gerais das nanopartículas, foi investigado o potencial de imunização pela via nasal com uma formulação contendo as NPs produzidas. Existem diferentes vias de administração de uma vacina que levam em conta os aspectos específicos do patógeno e o desenvolvimento da doença. A escolha da via intranasal

teve como principal fundamento o fato de ser uma abordagem atrativa para doenças infecciosas do trato respiratório, podendo induzir respostas imunológicas de mucosa e sistêmicas (Bouazzaoui; Abdellatif, 2024). A imunização realizada promoveu a produção de anticorpos séricos IgG nos grupos NPPI+Pa, PBS+Pa e NPV+Pa (Figura 9), porém sem diferença estatística entre esses três grupos. Ao investigar a produção de anticorpos IgM e IgA séricos anti-*P. aeruginosa* o ensaio de ELISA não revelou sensibilização das amostras, revelando uma produção inexpressiva destes tipos de anticorpos. Ao verificar o efeito protetivo no uso de NPs de BSA em infecção nasal por *P. aeruginosa*, Rodrigues, verificou que camundongos Swiss imunizados via subcutânea com nanopartículas contendo proteínas da bactéria apresentaram uma maior produção de subtipos de IgG enquanto que os animais tratados com as NPs vazias não apresentaram valores tão elevados (Rodrigues *et al.*, 2013). Em outro estudo, Morais, também verificou que o uso de nanopartículas associadas com as proteínas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) promoveu uma maior produção de IgG nas fêmeas Swiss imunizadas subcutaneamente e infectadas com a cepa PA14 em relação aos grupos tratados unicamente com as NPs (Morais *et al.*, 2018).

Existem algumas dificuldades em se formular vacinas contra patógenos que acometem as mucosas, como a *P. aeruginosa*, uma vez que pode haver inconsistência na formação de uma resposta sistêmica eficaz que ative diferentes respostas integrativas entre os sistemas inato e adaptativo que atuem também na mucosa infectada (Baker; Mclachlan; Morici, 2020). O uso de vacinações intranasais, pode apresentar algumas vantagens como induzir as respostas sistêmica e mucosa além de que o acesso a cavidade nasal é fácil (Birkhoff; Leitz; Marx, 2009). Ao administrar intraperitonealmente a substância como um indutor da imunidade inata, Ribes verificou que somente o uso da substância foi capaz de reduzir danos associados a infecção por *Escherichia coli* cepa K1 em fêmeas C57BL/6 (Ribes *et al.*, 2020).

Em modelos de tratamento para infecções virais, o uso adjuvante do poli I:C é capaz de induzir níveis mais expressivos de IgG, assim como verificado por Ichinohe. No referido estudo, o grupo de pesquisa realizou a vacinação intranasal de fêmeas BALB/c com hemaglutinina associada ao poli I:C e foi capaz de induzir um aumento da resposta imune nos animais desafiados com o vírus da influenza. (ICHINOHE *et al.*, 2005). A Figura 10 mostra um certo nível de anticorpos séricos, que foram mais presentes em animais dos grupos PBS+Pa (1:6400) e NPV+Pa (1:6400) ou seja, apresentaram títulos de anticorpos maiores que os grupos contendo Poli I:C em sua

associação (NPPI+Pa – 1:600 e NPPI – 1:3200). Logo, mesmo com fortes evidências anteriores de que nanopartículas contendo poli I:C possuam efeito estimulante e imunogênico, no respectivo trabalho a formulação não obteve o efeito esperado após a imunização pela via nasal.

O quadro de comportamento doentio (sickness behaviour) é uma resposta do organismo frente a uma infecção. Quando os PAMPs ativam uma resposta imune, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  podem ser liberadas e comunicarem-se com o sistema nervoso, levando a alterações comportamentais no indivíduo. Entre as possíveis alterações no indivíduo, destacam-se redução de motilidade, febre, entre outros aspectos (DANTZER, 2009). Este comportamento pode ser compreendido como uma estratégia evolutiva a fim de melhorar o combate frente a infecções, uma vez que o indivíduo torna-se menos ativo e a febre modula o combate da infecção (Kelley; Kent, 2020).

Contudo, uma resposta imune exacerbada pode ser fatal e prejudicar o combate de uma infecção ao ativar compulsivamente diversos mecanismos autolesivos as células e tecidos condição também conhecida como tempestade de citocinas (Fajgenbaum; June, 2020). O poli I:C, por apresentar suas propriedades miméticas a patógeno, pode induzir uma resposta inflamatória e uma resposta comportamental alterada, como redução na motilidade e na busca por alimento além de aspectos físicos como febre e perda de peso (Zhu *et al.*, 2016). Assim sendo, um dos aspectos levados em conta para verificar se a imunização influencia ou induz um comportamento doentio, é o acompanhamento do peso desses animais peso dos indivíduos (Figura 9). Tal parâmetro demonstra-se importante uma vez que a imunização não pode apresentar malefícios aos indivíduos tratados. Em um estudo com poli I:C adjuvante de células CAR-T, Di, também não verificou relação entre o composto e a perda de peso nos animais tratados com o imunogênico tal como não foi verificado efeito tóxico da molécula nos camundongos (Di *et al.*, 2019).

Por outro lado, Quinn observou uma redução de peso em camundongos tratados com um mix de adjuvantes contendo poli I:C e complexos imunoestimulatórios. Neste estudo, o micro-organismo eleito para infecção foi o *Listeria monocytogenes* e o poli I:C não foi o único adjuvante testado no tratamento. Mesmo que os camundongos tratados tenham apresentado um pouco de perda de peso ao longo da imunização, este fator não demonstrou ser tão impactante na saúde dos animais (Quinn *et al.*, 2013). Ao ser administrado com adjuvante via nasal, o poli

I:C também não demonstrou levar a reduções significativas e prejudiciais aos animais tratados como evidenciado por Girón ao verificar como o adjuvante poderia melhorar a resposta imune ativando vias de sinalização de células T frente ao vírus da influenza (Girón *et al.*, 2014). De modo geral, estudos com poli I:C como adjuvante vacinal mostram que o composto não leva a perdas significativas de peso dos animais tal como o uso da albumina, o que também foi verificado em nosso estudo (Figura 11). Algumas respostas inflamatórias podem ocorrer devido a sensibilização do sistema imune, mas as respostas são capazes de induzir comportamento doentio, ainda mais em baixas concentrações, que se distanciam dos níveis de toxicidade celular e sistêmica.

Decorrida a imunização, desafiou-se os animais com a *P. aeruginosa* linhagem PA14, para verificar se a imunização foi capaz de induzir efeito protetivo nos animais. Por meio da curva de mortalidade (Figura 10) é possível verificar que os grupos analisados apresentaram uma alta taxa de mortalidade e nas primeiras 24 horas, mais de 80% do número de indivíduos infectados já havia sucumbido a infecção. Ao desafiar os animais com *P. aeruginosa*, Morais, realizou um inóculo com a mesma carga bacteriana, por animal, e obteve taxas de sobrevivência maiores (Morais *et al.*, 2018). No grupo PBS, em ambos os trabalhos, as taxas de mortalidade foram similares, em ambos os casos após 24 de experimentação, as porcentagens de mortalidade alcançaram 80%. Contudo, os demais delineamentos de imunização apresentaram melhores taxas de sobrevivência, alcançando 50% na melhor situação. Apesar das similaridades inclusive no protocolo de infecção e imunização, a maior diferença entre esse trabalho e os anteriores foi na questão da via de imunização pois Morais, fez uso da via subcutânea, enquanto que para este trabalho a via nasal foi a escolhida para o tratamento, assim como a infecção.

Em vacinas intranasais, a mucosa nasal é o primeiro tecido que entra em contato com os antígenos administrados e este processo induz majoritariamente a produção de IgA. A secreção dos anticorpos é facilitada também pela alta vascularização dos tecidos e isso facilita com que ocorra a integração do sistema imune e ativação de células apresentadoras de antígeno como as DCs e macrófagos. Este processo visa treinar as demais células e facilitar a resposta de células B e T além de promover a sinalização de citocinas inflamatórias (Kehagia; Papakyriakopoulou; Valsami, 2020). Mesmo com o a prevalência de IgA, estudos mostram que no sítio da imunização há a produção de IgM e IgG que contribuem com

a imunidade de mucosa (Holmgren; Czerkinsky, 2005). A realidade é que o efeito protetivo de uma vacina não é algo simples e a eficácia da via de administração também é dependente do antígeno, do carreador, do veículo, adjuvantes escolhidos para tal finalidade além da própria biologia do micro-organismo associado a infecção (Su *et al.*, 2016). Assim sendo, acredita-se que a via de administração escolhida não tenha sido tão satisfatória, uma vez que apesar de não ter sido identificado IgA no soro, mucosas e pulmão, houve produção de anticorpos IgG séricos e nos pulmões contra a bactéria, indicativos de resposta sistêmica. Os anticorpos produzidos, provavelmente, não foram protetivos, sendo pouco eficientes para a eliminação do patógeno.

Como descrito anteriormente, o quadro de comportamento doentio é associado com alterações comportamentais do indivíduo que podem refletir, inclusive, na busca por alimentos e água e perda de peso (Maes *et al.*, 2012). Logo, sob tal perspectiva, após a infecção, avaliou-se também as alterações no peso dos animais (Figura 13) correlacionando também com a carga bacteriana e os danos evidenciados nos pulmões (Figura 14). Analisando-se a perda de pesos dos animais por grupo, não foram verificadas diferenças estatísticas, mostrando uma homogeneidade na resposta dos animais frente ao patógeno, um indicativo a mais de que talvez os anticorpos gerados pelos tratamentos não tenham sido capazes de neutralizar os micro-organismos e seus danos. Além disso, os níveis, em UFC, também foram iguais entre os grupos, o que releva uma infecção também homogênea entre os grupos. Estes dados são coerentes ao evidenciado por Heeckren ao descrever os efeitos da infecção por *P. aeruginosa* em camundongos C57BL/6. No estudo, foi utilizada a cepa M57-15, um isolado clínico de um paciente com CF. As bactérias foram inoculadas diretamente no pulmão direito a partir de um cateter inserido pela traqueia com os animais devidamente anestesiados a uma razão de  $6,5 \times 10^4$  UFC por animal. Apesar do inóculo de bactérias ter sido a uma razão de cerca de 1000 vezes menor em relação à infecção intra-nasal, Heeckren inseriu as bactérias diretamente nos pulmões, enquanto que no experimento deste respectivo documento, o inóculo dependeu da aspiração dos animais, o que faz com que as bactérias não atingissem obrigatoriamente os pulmões de imediato. Em ambos os casos, os animais infectados pelas bactérias apresentaram perda de peso, sendo que Heenckeren verificou um intervalo entre cerca de 5% a um valor máximo de  $13,7 \pm 1,3\%$ . Em contraponto, nos dados obtidos neste trabalho, os animais infectados apresentaram uma perda mínima

de 3,3% com perda máxima de  $16,9 \pm 1,8\%$  (Heeckeren *et al.*, 2000). De modo geral, outros trabalhos também apontam para perdas de peso em animais desafiados com *P. aeruginosa*.

A proliferação bacteriana nos pulmões junto as perdas de peso e mortalidade também são um indicativo que os animais não desenvolveram uma resposta imunológica local tão eficaz ao ponto de conter a infecção. A Figura 15 mostra que a produção de IgG no tecido pulmonar foi não significativa em todos os grupos, com exceção de NPV+Pa, um grupo cuja imunização está relacionada as proteínas totais de *P. aeruginosa*. Contudo, as análises histopatológicas (Figura 16) revelam que nenhum dos tratamentos foi capaz de induzir uma resposta satisfatória na contenção da infecção e dos danos teciduais. Esses dados são um indicativo de que mesmo que o tratamento tenha levado a produção de anticorpos, estes não foram eficientes em neutralizar as bactérias. Devido à destruição dos alvéolos, as trocas gasosas nos pulmões são prejudicadas podendo levar a insuficiência respiratória, que também é um agravante na morte dos animais. Em suas análises histopatológicas, Rodrigues obteve melhores efeitos protetivos nos pulmões, uma vez que seu tratamento com NPs levou a uma maior preservação do tecido. Os animais tratados com nanopartículas associadas com proteínas de *P. aeruginosa* se sobressaíram apresentaram uma pontuação de dano tecidual baixa, próxima de 0. (Rodrigues *et al.*, 2013). Em seus tratamentos, por sua vez, Morais verificou um maior grau de preservação tecidual nos animais imunizados com NPs vazias e NPPa (Morais *et al.*, 2018). Apesar das similaridades nos tratamentos e modelo com estes trabalhos, os resultados obtidos pela administração da via nasal dos imunogênicos levou a um quadro diferente, sem efeito protetivo.

Portanto, as vacinações apresentarem a produção de níveis de IgG séricos e pulmonares, em menor quantidade, sem prejudicar o ganho de peso dos animais. Após o desafio com a *P. aeruginosa* os camundongos apresentaram alta mortalidade, acentuada perda de peso e grande destruição do epitélio pulmonar, o que indica que os anticorpos produzidos não apresentaram efeito protetivo contra o patógeno. Além disso, a inexpressividade de anticorpos IgA anti-*P. aeruginosa*, revela que a vacinação não foi capaz de induzir uma imunidade de mucosa como era esperado por meio da via de administração. Os delineamentos vacinais por via de administração intra peritoneal, por sua vez, já foram mostrados como mais eficientes na indução de efeitos protetivos contra a infecção pelo patógeno, sendo o comparativo deste trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

O tratamento delineado com uso nanopartículas de BSA com ou sem associação do ácido polininosínico:policitidílico (poli I:C) não apresentou um resultado satisfatório na indução de resposta imunológica dos animais desafiados com *P. aeruginosa*. A síntese das NPs que interagem com as proteínas de *P. aeruginosa*, formando uma camada proteica não ocorreu como o esperado. Apesar dos diferentes tratamentos não induzirem alterações comportamentais, perda de peso dos animais tratados e promoverem o estímulo na produção de IgG sérico e minimamente nos pulmões, os anticorpos não demonstraram uma ação eficaz no controle da infecção. Com base em outros resultados do grupo de pesquisa e em outros dados da literatura, acredita-se que a via de administração escolhida não tenha sido a mais efetiva para a indução de uma resposta imune protetora contra *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, A. A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02122-1>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- AGGARWAL, P. *et al.* Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 428–437, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- AGGEN, J. B. *et al.* Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4636–4642, 2010.
- AIT TAYEB, L. *et al.* Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 763–773, 2005.
- ALHAZMI, A. NOD-like receptor(s) and host immune responses with *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Inflammation Research**, v. 67, n. 6, p. 479–493, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-018-1132-0>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- ALKIE, T. N. *et al.* Enhancing innate antiviral immune responses in rainbow trout by double stranded RNA delivered with cationic phytoglycogen nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-49931-2>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.
- AMMI, R. *et al.* Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 146, p. 120–131, 2015.
- ANDRESEN, A. M. S.; GJØEN, T. Chitosan nanoparticle formulation attenuates poly (I:C) induced innate immune responses against inactivated virus vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 40, 2021.
- BAKER, S. M.; MCLACHLAN, J. B.; MORICI, L. A. Immunological considerations in the development of *Pseudomonas aeruginosa* vaccines. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 16, n. 2, p. 412–418, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1650999>. Acesso em: 29 ago. 2024
- BERRAZEG, M. *et al.* Mutations in  $\beta$ -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6248–6255, 2015.
- BERTONCHELI, C. DE M.; HORNER, R. A review on metallo-beta-lactamases. **Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas**, v. 44, n. 4, p. 577–599, 2008.
- BILTON, D. Update on non-cystic fibrosis bronchiectasis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 14, n. 6, p. 595–599, 2008.
- BIRKHOFF, M.; LEITZ, M.; MARX, D. Advantages of intranasal vaccination and considerations on device selection. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 6, p. 729–731, 2009.

- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.
- BLANCHETTE *et al.* Healthcare cost and utilization before and after diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis in the U . S . **Medical sciences**, 2017.
- BLOMQUIST, K. C.; NIX, D. E. A Critical Evaluation of Newer  $\beta$ -Lactam Antibiotics for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 55, n. 8, p. 1010–1024, 2021.
- BORASCHI, D. *et al.* Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. **Seminars in Immunology**, v. 34, p. 33–51, Aug. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.013>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- BOUAZZAOUI, A.; ABDELLATIF, A. A. H. Vaccine delivery systems and administration routes: Advanced biotechnological techniques to improve the immunization efficacy. **Vaccine: X**, v. 19, 2024.
- BOYCE, P. Introduction To the Family Araceae. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 12, n. 3, p. 122–125, 1995.
- BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419–426, 2011.
- BRUDERER, U. *et al.* Affinity constants of naturally acquired and vaccine-induced anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibodies in healthy adults and cystic fibrosis patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 2, p. 344–349, 1992.
- BUJACZ, A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 10, p. 1278–1289, 2012.
- CHANDLER, C. E. *et al.* Genomic and phenotypic diversity among ten laboratory *P.aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 201, p. 1–18, 2019.
- CHATTERJEE, M. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 48–58, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.004>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- CHEN, Z. *et al.* Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. **Toxicology Letters**, v. 163, n. 2, p. 109–120, 2006.
- CHOI, Y. *et al.* Clinical Predictors of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in Emergency Department . **Emergency Medicine International**, v. 2018, p. 1–6, 2018.
- CLAEYS, K. C. *et al.* Antimicrobial stewardship opportunities in critically ill patients with gram-negative lower respiratory tract infections: A multicenter cross-sectional analysis. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 135–146, 2018.
- CLOKIE, M. R. J. *et al.* Phages in nature. **Bacteriophage**, v. 1, n. 1, p. 31–45, 2011.
- COLAPICCHIONI, V. *et al.* Killing cancer cells using nanotechnology: Novel poly(I:C) loaded liposome-silica hybrid nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 37, p. 7408–7416, 2015.
- TAHBAZ, S. V.; YAHYAZADEH. H.; JAYAPAL. S. K. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019 : a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 22, p. 2221–2248, 2022.

- COSTA, G. B. DA *et al.* Aspectos microbiológicos, clínicos e epidemiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital universitário / Microbiological, clinical and epidemiological aspects of healthcare-associated infection. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 27069–27085, 2022.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.
- CURRAN, C. S.; BOLIG, T.; TORABI-PARIZI, P. Mechanisms and targeted therapies for *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 197, n. 6, p. 708–727, 2018.
- DACOPA, T. G. *et al.* Arginine-Based Poly(I:C)-Loaded Nanocomplexes for the Polarization of Macrophages Toward M1-Antitumoral Effectors. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–17, July 2020.
- DANTZER, R. Cytokine sickness behavior and depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247–264, 2009.
- DAS, T.; SEHAR, S.; MANEFIELD, M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 778–786, 2013.
- DAULETBAEV, N. *et al.* Stimulation of the RIG-I/MAVS pathway by polyinosinic:polycytidylic acid upregulates IFN- $\beta$  in airway epithelial cells with minimal costimulation of IL-8. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2829–2841, 2015.
- DAVID, Marie Nicole V.; AKHONDI, Hossein. Emulsions. **Stat Pearls**, [s. l.], Jan. 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559084>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. *et al.* Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580–589, 2013.
- DE MATOS, E. C. O. *et al.* Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 305–311, 2016.
- DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.
- DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 808–816, 2009.
- DI, S. *et al.* Combined adjuvant of poly I:C improves antitumor effects of CAR-T cells. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1–11, Apr., 2019.
- DÍAZ SANTOS, E. *et al.* Treatment of severe multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Medicina Intensiva**, v. 46, n. 9, p. 508–520, 2022.
- DIVAKAR, S.; LAMA, M.; ASAD U., K. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, p. 76, 2019.
- DOBROVOLSKAIA, M. A. *et al.* Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Molecular Pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 487–495, 2009. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp800032f>. Acesso em: 30 ago. 2024.

- DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nanoscience and Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals**, p. 278–287, 2009.
- DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 351–368, 2007.
- DUBIN, P. J. *et al.* Interleukin-23-mediated inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 1, p. 398–409, 2012.
- EALIAS, A. M.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 263, n. 3, 2017.
- NATURE EDUCATION. Mutation. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/definition/mutation-8/>. Acesso em: 30 ago. 2024.
- ELFADADNY, A. *et al.* Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 2, p. 129–137, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 168–182, 2012.
- ERNST, R. K. *et al.* Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1341–1349, 2003.
- FABRE, V. *et al.* Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: How long is long enough? **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 11, p. 2011–2014, 2019.
- FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 2020.
- FASANO, M. *et al.* The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. **IUBMB Life**, v. 57, n. 12, p. 787–796, 2005.
- FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa. **Unifesp**, p. 1–51, 2019. Disponível em: [https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia\\_Eutanasia\\_UNIFESP\\_verso\\_final\\_042019.pdf](https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia_Eutanasia_UNIFESP_verso_final_042019.pdf). Acesso em: 29 ago. 2024.
- FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–681, 2012.
- FERRARA, S. *et al.* The PAPI-1 pathogenicity island-encoded small RNA PesA influences *Pseudomonas aeruginosa* virulence and modulates pyocin S3 production. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–20, 2017.
- FIELD, A. K. *et al.* Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, n. 3, p. 1004–1010, 1967.
- FIFIS, T. *et al.* Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3148–3154, 2004.

- FONG, J. N. C.; YILDIZ, F. H. Bio film Matrix Proteins. **Microbiology Spectr**, v. 3, p. 201–222, 2015.
- FRANCHI, L.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NÚÑEZ, G. Sensing and Reacting to Microbes via the Inflammasomes (NIH Public Access Author manuscript). **Nature Immunology**, v. 13, n. 4, p. 325–332, 2012.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.
- GHSSEIN, G.; EZZEDDINE, Z. A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. **Biology**, v. 11, n. 12, 2022.
- GOMILA, M. *et al.* Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–13, Mar. 2015.
- GONZÁLEZ-ALSINA, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and the Complement System: A Review of the Evasion Strategies. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2023.
- GOSSELIN, D. *et al.* Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3272–3278, 1995.
- GRACE, A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. October, p. 1–15, 2022.
- GREEN, M.; APEL, A.; STAPLETON, F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. **Cornea**, v. 27, n. 1, p. 22–27, 2008.
- GREER, N. D. Doripenem (Doribax): The Newest Addition to the Carbapenems. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 21, n. 3, p. 337–341, 2008.
- GRIMWOOD, K. *et al.* Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 14–20, 2015.
- GU, J. L. *et al.* The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. **Science China Life Sciences**, v. 54, n. 9, p. 793–805, 2011.
- GURUNATHAN, S. *et al.* Nanovaccines: an effective therapeutic approach for cancer therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 170, Dec, 2023.
- GWINN, M. R.; VALLYATHAN, V. Nanoparticles: Health effects - Pros and cons. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1818–1825, 2006.
- HAFNER, A. M.; CORTHÉSY, B.; MERKLE, H. P. Particulate formulations for the delivery of poly(I: C) as vaccine adjuvant. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1386–1399, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.013>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- HARRISON, E. M. *et al.* Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1437–1446, 2010.
- HIRANO, S. A current overview of health effect research on nanoparticles. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 14, n. 4, p. 223–225, 2009.
- HOFER, U. The cost of antimicrobial resistance. **Research Highlights**, v. 17, 2019.
- HØIBY, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2001.
- HOLLOWAY, B. W. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of general microbiology**, v. 13, n. 3, p. 572–581, 1955.

- HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4, p. 45-53, 2005.
- HOLT, P. G. *et al.* Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 2, p. 142–152, 2008.
- HOUSTON, N. *et al.* Sputum neutrophils in cystic fibrosis patients display a reduced respiratory burst. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 12, n. 4, p. 352–362, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.11.004>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- HU, J.; YU, S.; YAO, P. Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly. **Langmuir**, v. 23, n. 11, p. 6358–6364, 2007.
- ICHINOHE, T. *et al.* Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2910–2919, 2005.
- IJAZ, I. *et al.* Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 13, n. 3, p. 59–81, 2020.
- INOUE, K. I.; TAKANO, H. Aggravating impact of nanoparticles on immune-mediated pulmonary inflammation. **TheScientificWorldJournal**, v. 11, p. 382–390, 2011.
- JAHANSHAH, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4926–4934, 2008.
- JAKUBOVICS, N. S. *et al.* The dental plaque biofilm matrix. **Periodontology 2000**, v. 86, n. 1, p. 32–56, 2021.
- JASANI, B.; NAVABI, H.; ADAMS, M. Ampligen: A potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. **Vaccine**, v. 27, n. 25–26, p. 3401–3404, 2009.
- JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018.
- JOUDEH, N.; LINKE, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–29, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- KABELITZ, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 39–45, 2007.
- KADRI, S. S. *et al.* Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: Retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 12, p. 1803–1814, 2018.
- KAJAL; PATHANIA, A. R. Chemistry behind Serum Albumin: A Review. **E3S Web of Conferences**, v. 309, p. 1–10, 2021.
- KAKASIS, A.; PANITSA, G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 1, p. 16–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- KARLSSON, M.; EDFORS-LILJA, I.; BJÖRNSSON, S. Binding and detection of glycosaminoglycans immobilized on membranes treated with cationic detergents. **Analytical Biochemistry**, v. 286, n. 1, p. 51–58, 2000.

- KARMAKAR, M. *et al.* Cutting Edge: IL-1 $\beta$  Processing during *Pseudomonas aeruginosa* Infection Is Mediated by Neutrophil Serine Proteases and Is Independent of NLRP4 and Caspase-1. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4231–4235, 2012.
- KEHAGIA, E.; PAPAKYRIAKOPOULOU, P.; VALSAMI, G. Advances in intranasal vaccine delivery: A promising non-invasive route of immunization. **Vaccine**, v. 41, p. 3589-3603, 2023.
- KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 218–224, 2010.
- KELLEY, K. W.; KENT, S. The Legacy of Sickness Behaviors. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 1–5, Dec. 2020.
- KESTING, R. E. Phase Inversion Membranes. **ACS Symposium Series**, n. 1967, p. 131–164, 1985.
- KETRAT, S.; JAPRUNG, D.; PONGPRAYOON, P. Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 98, p. 1–8, 2020.
- KHASHEII, B.; MAHMOODI, P.; MOHAMMADZADEH, A. Siderophores: importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. **Microbiological Research**, v. 250, May, 2021.
- KHEIROLLAHPOUR, M. *et al.* Nanoparticles and Vaccine Development. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 6–21, 2019.
- KHRAMTSOV, P. *et al.* Modified desolvation method enables simple one-step synthesis of gelatin nanoparticles from different gelatin types with any bloom values. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1–26, 2021.
- KIFFER, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 216–224, 2005.
- KLOCKGETHER, J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–18, July, 2011.
- KLOTH, C. *et al.* The role of *Pseudomonas aeruginosa* exoy in an acute mouse lung infection model. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2018.
- KOEBNIK, R.; LOCHER, K. P.; VAN GELDER, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 239–253, 2000.
- KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.010>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- KUHN, D. A. *et al.* Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1625–1636, 2014.
- KUMAR, E. A. *et al.* Human and environmental impacts of nanoparticles: a scoping review of the current literature. **BMC Public Health**, v. 23, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12889-023-15958-4>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- KUMAR, H. *et al.* Cutting Edge: Cooperation of IPS-1- and TRIF-Dependent Pathways in Poly IC-Enhanced Antibody Production and Cytotoxic T Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 2, p. 683–687, 2008.

- KWON, Y. J. *et al.* Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 3, p. 199–212, 2005.
- LANGAN, K. M.; KOTSIMBOS, T.; PELEG, A. Y. Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 547–556, 2015.
- LANGER, K. *et al.* Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1–2, p. 169–180, 2003.
- LANGEVIN, A. M.; DUNLOP, M. J. Stress introduction rate alters the benefit of AcrABTolC efflux pumps. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 1, 2018.
- LAU, G. W. *et al.* The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 12, p. 599–606, 2004.
- LAVOIE, E. G.; WANGDI, T.; KAZMIERCZAK, B. I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 14–15, p. 1133–1145, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- LEE, D. G. *et al.* Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome Biology**, v. 7, n. 10, 2006.
- LEI, R. *et al.* Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: A rapid in vivo screening method for nanotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 232, n. 2, p. 292–301, 2008.
- LI, Y. G. *et al.* Poly (I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. **Virology Journal**, v. 9, p. 1–8, 2012.
- LIAO, C. *et al.* Virulence factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1–17, July, 2022.
- LIN, W. Introduction: Nanoparticles in Medicine. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10407–10409, 2015.
- LIU, YUAN *et al.* Surface hydrophobicity of microparticles modulates adjuvanticity. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 32, p. 3888–3896, 2013.
- LIU, YUANCHANG *et al.* system. p. 25–32, 2018.
- LOEWE, L. **Genetic Mutation**. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-mutation-1127/#:~:text=Mutational effects can be beneficial,mutation%27s probability of being deleterious>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- LORUSSO, A. B. *et al.* Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, 2022.
- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.
- MAES, M. *et al.* Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. **BMC Medicine**, v. 10, p. 1–19, 2012.
- MAHMOUDI, M. *et al.* The protein corona from nanomedicine to environmental science. **Nature Reviews Materials**, v. 8, n. 7, p. 422–438, 2023.
- MAMO, T.; POLAND, G. A. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6609–6611, 2012.

- MANDSBERG, L. F. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2483–2491, 2009.
- MORAIS, S. M. S. *et al.* Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **Vaccine**, v. 36, n. 43, p. 6408–6415, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.070>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- SILVA, V. M. *et al.* Pulmonary toxicity of silica linked to its micro- or nanometric particle size and crystal structure: A Review. **Nanomaterials**, v. 12, 2022.
- MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, n. 1, p. 33–39, 2014.
- MARTINS, K. A. O.; BAVARI, S.; SALAZAR, A. M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 3, p. 447–459, 2015.
- MATHEE, K. Forensic investigation into the origin of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 — old but not lost. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 1019–1021, 2018.
- MATSUMIYA, T.; STAFFORINI, D. M. Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 6, p. 489–513, 2010.
- MAYHALL, C. G. The epidemiology of burn wound infections: Then and now. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 543–550, 2003.
- MCCARTNEY, S. *et al.* Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly(I:C)-mediated activation of mouse NK cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 2967–2976, 2009.
- MCCLEMENTS, D. J. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 241–269, 2010.
- MCEWAN, D. L.; KIRIENKO, N. V.; AUSUBEL, F. M. Host translational inhibition by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A triggers an immune response in *Caenorhabditis elegans*. **Cell Host and Microbe**, v. 11, n. 4, p. 364–374, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.007>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- MERLOT, A. M.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–7, Aug., 2014.
- MERODIO, M. *et al.* Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and in vitro release properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 251–259, 2001.
- MICHALSKA, M.; WOLF, P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–7, Sep., 2015.
- MIHAI, M. M. *et al.* Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 55, n. 4, p. 1401–1408, 2014.
- MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 7, p. 225–232, 1995.
- MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 842–850, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006>. Acesso em: 29 ago. 2024.

- MISSAOUI, W. N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 1–12, 2018.
- MITTAL, R. *et al.* Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. **Journal of Infection and Public Health**, v. 2, n. 3, p. 101–111, 2009.
- MIYOSHI-AKIYAMA, T. *et al.* Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 12, p. 3238–3245, 2017.
- MOGAYZEL, P. J. *et al.* Cystic fibrosis foundation pulmonary guideline pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 10, p. 1640–1650, 2014.
- MOMAN, R. N.; GUPTA, N.; VARACALLO, M. **Physiology, Albumin**. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/#:~:text=Synthesis of albumin takes place,an indication of underlying pathology](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/#:~:text=Synthesis of albumin takes place,an indication of underlying pathology. Acesso em: 9 nov. 2023). Acesso em: 9 nov. 2023.
- MOORE, T. A. *et al.*  $\gamma\delta$ -T Cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella Pneumonia*. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2643–2650, 2000.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-29, Feb., 2017.
- MORROW, A. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y: a promiscuous nucleotidyl cyclase edema factor and virulence determinant K. **Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 67-85, Aug., 2018.
- MOSER, C. *et al.* Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–15, Feb., 2021.
- MOYANO, D. F. *et al.* Fabrication of corona-free nanoparticles with tunable hydrophobicity. **ACS Nano**, v. 8, n. 7, p. 6748–6755, 2014.
- MUDALIGE, T. *et al.* Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. **Nanomaterials for food applications**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- MUELLER-ORTIZ, S. L.; DROUIN, S. M.; WETSEL, R. A. The Alternative Activation Pathway and Complement Component C3 Are Critical for a Protective Immune Response against *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2899–2906, 2004.
- MUNDEKKAD, D.; CHO, W. C. Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer MUNITA, J.; ARIAS, C. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 17, n. 2, p. 1–37, 2016.
- NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe nanoparticles: Are we there yet? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–22, 2021.
- NAVABI, H. *et al.* A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen®) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro. **Vaccine**, v. 27, n. 1, p. 107–115, 2009.
- NEVES, P. R. *et al.* *Pseudomonas: Pseudomonas aeruginosa*. **Encyclopedia of food microbiology (second edition)**, v. 3, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00283-4>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- O'HAGAN, D. T.; RAPPUOLI, R. Novel approaches to vaccine delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 9, p. 1519–1530, 2004.

- OBRITSCH, M. D. *et al.* Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and treatment options. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 10 I, p. 1353–1364, 2005.
- OH, W. K. *et al.* Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-Titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 5301–5313, 2010.
- OZER, E. A.; ALLEN, J. P.; HAUSER, A. R. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools spine and agent. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2014.
- PAIK, S. Y. R. *et al.* Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 695–701, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.059>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* story. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1377–1383, 2010.
- PAN, T. *et al.* IL17-producing  $\gamma\delta$  T cells may enhance humoral immunity during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, p. 1–8, Dec., 2016.
- PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019.
- PANKUCH, G. A. *et al.* Activity of ACHN-490 tested alone and in combination with other agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2463–2465, 2011.
- PAONE, A. *et al.* Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC- $\alpha$ -dependent mechanism. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 7, p. 1334–1342, 2008.
- PARKER, C. M. *et al.* Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence, incidence, risk factors, and outcomes. **Journal of Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 18–26, 2008.
- PARRISH, D. A. *et al.* Pulmonary response of fifth component of complement-sufficient and -deficient mice to hyperoxia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 3, p. 956–965, 1984.
- PATERSON, D. L.; DEPESTEL, D. D. Doripenem. **Reviews of anti-infective agents**, v. 49, n. 2, p. 291–298, 2009.
- PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v. 15, p. 66–70, 2004. Disponível em: <http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/84/i03-perfil.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- PEEK, L. J.; MIDDAGH, C. R.; BERKLAND, C. Nanotechnology in vaccine delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 8, p. 915–928, 2008.
- PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1132–1147, 2009.
- PÉREZ-GIRÓN, J. V. *et al.* Mucosal Polyinosinic-Polycytidylic Acid Improves Protection Elicited by Replicating Influenza Vaccines via Enhanced Dendritic Cell Function and T Cell Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1324–1332, 2014.

- PIDDOCK, L. J. V. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629–636, 2006. Disponível em: [www.nature.com/reviews/micro](http://www.nature.com/reviews/micro). Acesso em: 29 ago. 2024.
- POULSEN, B. E. *et al.* Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 20, p. 10072–10080, 2019.
- PRAJAPATI, R.; GARCIA-GARRIDO, E.; SOMOZA, Á. Albumin-based nanoparticles for the delivery of doxorubicin in breast cancer. **Cancers**, v. 13, n. 12, 2021.
- PRICOP, D.; ANDRIEȘ, M. Endocytosis and Exocytosis of Gold Nanoparticles. **Romanian J. Biophys**, v. 25, n. 1, p. 63–71, 2015.
- PRIYANKA *et al.* Nanovaccines: A game changing approach in the fight against infectious diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115597, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115597>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- QIN, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–27, 2022.
- QIU, X.; GURKAR, A. U.; LORY, S. Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 52, p. 19830–19835, 2006.
- QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S.; EVANS, T. W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1211–1219, 2005.
- QUINN, K. M. *et al.* Coadministration of Polyinosinic:Polycytidylic Acid and Immunostimulatory Complexes Modifies Antigen Processing in Dendritic Cell Subsets and Enhances HIV Gag-Specific T Cell Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 10, p. 5085–5096, 2013.
- RAHIMNEJAD, M.; JAHANSHAHI, M.; NAJAFPOUR, G. D. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. **African Journal of Biotechnology**, 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**, v. 8, n. 19, p. 4738–4743, 2009.
- 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**, v. 4, n. 10, 2009.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 2013.
- REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- RIBES, S. *et al.* Pre-treatment with the viral Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C) modulates innate immunity and protects neutropenic mice infected intracerebrally with *Escherichia coli*. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2020.
- ROBINSON, R. A. *et al.* A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosinic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 57, n. 3, p. 599–602, 1976.

- RODRIGUES, N. F. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5062–5066, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.078>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- ROSENTHAL, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 12, p. 1495–1504, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.08.007>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- ROUTHIER A *et al.* Pharmacological inhibition of Rho-kinase signaling with Y-27632 blocks melanoma tumor growth. **Oncology Reports**, v. 23, n. 3, p. 861–867, 2010. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/or/23/3/861>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- RUFFIN, M.; BROCHIERO, E. Repair process impairment by *Pseudomonas aeruginosa* in epithelial tissues: major features and potential therapeutic avenues. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1–18, May., 2019.
- 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**, v. 43, n. 4, p. 328–334, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.007>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- SAFARI ZANJANI, L. *et al.* Exotoxin A-PLGA nanoconjugate vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection: protectivity in murine model. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2669-y>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, p. 1–6, 2004.
- SALEEM, H. *et al.* Bio-characterization of food grade pyocyanin bio-pigment extracted from chromogenic *Pseudomonas* species found in Pakistani native flora. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 103005, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103005>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- SALOMONI, R. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 10, p. 115–121, 2017.
- SANDOVAL-MOTTA, S.; ALDANA, M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: A systems biology perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 253–267, 2016.
- SANTUCCI, S. G. *et al.* Infections in a burn intensive care unit: Experience of seven years. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 1, p. 6–13, 2003.
- SATO, H. *et al.* Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1192–1195, 2005.
- SATO, H. *et al.* The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. **EMBO Journal**, v. 22, n. 12, p. 2959–2969, 2003.
- SAUER, K. *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.
- SAWA, T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretory toxin ExoU and its predicted homologs. **Toxins**, v. 8, n. 11, 2016.
- SCHALK, I. J.; PERRAUD, Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. **Environmental Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 811–831, 2023.

- SELVARAJA, V. K.; GUDIPUDI, D. K. Fundamentals to clinical application of nanoparticles in cancer immunotherapy and radiotherapy. **Ecancermedicalscience**, v. 14, n. 10, p. 1–12, 2019.
- SHARMA, A.; KRAUSE, A.; WORGALL, S. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. **Human Vaccines**, v. 7, n. 10, p. 999–1011, 2011.
- SHAVER, C. M. *et al.* Relative Contributions of. *Society*, v. 72, n. 12, p. 6969–6977, 2004.
- SHI, H. *et al.* Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 1, 2013.
- SIEBS, E. *et al.* Targeting the central pocket of the *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA. **ChemBioChem**, v. 23, n. 3, 2022.
- SKAAR, E. P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 1–2, 2010.
- SMITS, E. L. J. M. *et al.* Proinflammatory response of human leukemic cells to dsRNA transfection linked to activation of dendritic cells. **Leukemia**, v. 21, n. 8, p. 1691–1699, 2007.
- SOBEL, D. O. *et al.* Poly I:C induces development of diabetes mellitus in BB rat. **Diabetes**, v. 41, n. 4, p. 515–520, 1992.
- SOLANKI, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2019.
- SPENCER, W. H. *Pseudomonas aeruginosa* infections of the eye. **California medicine**, v. 79, n. 6, p. 438–443, 1953.
- SPETH, M. T. *et al.* Poly(I:C)-Encapsulating Nanoparticles Enhance Innate Immune Responses to the Tuberculosis Vaccine Bacille Calmette-Guérin (BCG) via Synergistic Activation of Innate Immune Receptors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 4098–4112, 2017.
- SRINIVAS, N. *et al.* Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Science**, v. 327, n. 5968, p. 1010–1013, 2010.
- SRIVASTAVA, A.; PRAJAPATI, A. Albumin and functionalized albumin nanoparticles: Production strategies, characterization, and target indications. **Asian Biomedicine**, v. 14, n. 6, p. 217–242, 2020.
- STAROSTA, V. *et al.* Oxidative changes of bronchoalveolar proteins in cystic fibrosis. **Chest**, v. 129, n. 2, p. 431–437, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.129.2.431>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.
- STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959–964, 2000.
- SU, F. *et al.* Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 4, p. 1070–1079, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1114195>. Acesso em: 29 ago. 2024.
- SU, S.; KANG, P. M. Systemic review of biodegradable nanomaterials in nanomedicine. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, 2020.
- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, n. 1, p. 014104, 2010.
- TAKAMI AKAGI; BABA, M.; AKASHI, M. Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. **Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems**, p. 31, 2011.

- TAMBER, S.; HANCOCK, R. E. W. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas* **Frontiers in bioscience**, p. 472–483, 2003.
- TART, A. H.; WOLFGANG, M. C.; WOZNIAK, D. J. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 23, p. 7955–7962, 2005.
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 1–25, 2020.
- TOMIĆ, S. *et al.* Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–13, 2014.
- TUON, F. F. *et al.* Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A Review. **Pathogens**, v. 11, n. 3, 2022.
- UDAY RAJ, J. *et al.* Effect of Unipolar Acu-Stim on Muscle Re-Education Following Tendon Transfer - A Case Study. **International Journal of Physiotherapy**, v. 2, n. 1, p. 347, 2015.
- VAN HEECKEREN, A. M. *et al.* Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 271–279, 2000.
- VENTOLA, C, L. The Antibiotics. **Comprehensive Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.
- VENTURINI, J. Application of ferrite nanoparticles in wastewater treatment. **Engineering Materials**, v. 1, p. 141–151, Jan., 2019.
- WALKTY, A. *et al.* In vitro activity of plazomicin against 5,015 gram-negative and gram-positive clinical isolates obtained from patients in canadian hospitals as part of the CANWARD study, 2011-2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2554–2563, 2014.
- WALTERS III, M. C. *et al.* Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 317–323, 2003.
- WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1227–1249, 2017.
- WEBER, C. *et al.* Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, n. 1, p. 91–102, 2000.
- WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. **Respirology**, v. 15, n. 7, p. 1037–1056, 2010.
- WOLFGANG, M. C. *et al.* Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8484–8489, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antibiotic resistance. **WHO**, [s.l.], 21 nov. 2023 Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em: 9 nov. 2023.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva, WHO Document Production Services, 2017, p. 1–28.
- WU, T.; TANG, M. Review of the effects of manufactured nanoparticles on mammalian target organs. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 25–40, 2018.

- XIAO, W. *et al.* Prolonged in vivo circulation time by zwitterionic modification of magnetite nanoparticles for blood pool contrast agents. **Contrast Media and Molecular Imaging**, v. 7, n. 3, p. 320–327, 2012.
- YILDIRIMER, L. *et al.* Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. **Nano Today**, v. 6, n. 6, p. 585–607, 2011.
- ZHU, X. *et al.* A distinct brain pathway links viral RNA exposure to sickness behavior. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, June, 2016.
- ZOLNIK, B. S. *et al.* Minireview: Nanoparticles and the immune system. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 458–465, 2010.
- ZUBER, B. *et al.* Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. **The journal of immunology**, v. 181, n.12, 2008.

## ANEXO A – Certidão de aprovação do comitê de ética.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao Poli I:C sobre a microbiota de camundongos e o impacto dessa modificação na infecção por Pseudomonas aeruginosa**, registrada com o nº **0034/2021**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Leomil Coelho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/08/2021 a 31/12/2022**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/6	80	0	80	Central unifal

Alfenas, 11 de Setembro de 2023

**Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira**

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG