

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NAIARA FERREIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL EM CAMUNDONGOS
SWISS IMUNIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA
ASSOCIADAS AOS ANTÍGENOS TOTAIS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Alfenas/ MG

2014

NAIARA FERREIRA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL EM CAMUNDONGOS
SWISS IMUNIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA
ASSOCIADAS AOS ANTÍGENOS TOTAIS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.
Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/ MG

2014

Rodrigues, Naiara Ferreira.

Avaliação da resposta imunológica humoral em camundongos Swiss imunizados com Nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de pseudomonas aeruginosa. / Naiara Ferreira Rodrigues - 2014.

69 f. -

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

NAIARA FERREIRA RODRIGUES

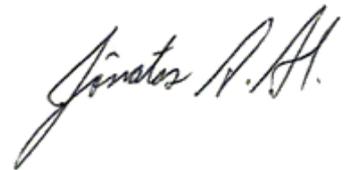
**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL EM CAMUNDONGOS
SWISS IMUNIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA
ASSOCIADAS AOS ANTÍGENOS TOTAIS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

A Banca examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Aprovada em: 22 de agosto de 2014

Professor: Jônatas Santos Abrahão
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura:



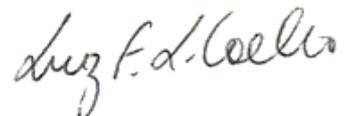
Professor: Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Professor: Luiz Felipe Leomil Coelho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



A Deus, pela força e coragem. Aos meus pais, namorado e toda minha família que, com muito carinho, sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas por oferecer a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Ao Professor Doutor Luiz Felipe Leomil Coelho, exemplo de profissionalismo, dedicação e paciência, o qual me acolheu mais uma vez e foi fundamental na minha formação.

Aos demais professores, que dedicam seu tempo a compartilhar conosco seu conhecimento, nos tornando pessoas mais sábias.

Aos amigos de laboratório, Alessandra, Andressa, Bianca, Carol, Érik, Isabela, Lauro, Luiz Gustavo, Marcílio e Raissa, pelo apoio, cumplicidade e enorme colaboração neste projeto.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Exemplos de vida que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

À minha família e amigos pelo carinho e atenção.

Ao meu namorado, Danilo, pela paciência, incentivo e principalmente pelo carinho. Obrigada por me dar força e coragem para enfrentar mais uma etapa longe de casa, me apoiando nos momentos de dificuldades.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um importante patógeno humano oportunista que causa graves infecções em pacientes imunocomprometidos e em pacientes portadores de fibrose cística (FC). O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* em proteger camundongos do desafio pela via nasal por este patógeno. Camundongos foram imunizados pela via subcutânea usando antígenos totais de *P. aeruginosa*, nanopartículas vazias ou nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* nos dias 0, 7 e 14. A produção de anticorpos IgG total e os subtipos IgG1 e IgG2a foram avaliados por ELISA. Os camundongos imunizados foram desafiados com *P. aeruginosa* e os pulmões foram coletados para estudos histopatológicos e detecção da bactéria no pulmão. Nossos resultados mostram que camundongos imunizados com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* produziram altos títulos de anticorpos IgG1 anti-*P. aeruginosa* e títulos significativos de IgG2a. Os dados também mostram que camundongos imunizados com nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* e desafiados com a bactéria apresentaram diminuição dos sinais inflamatórios, com uma redução significativa na intensidade e concentração de células inflamatórias, diminuição da hemorragia, sinais de edema e hiperemia nos pulmões se comparado aos outros grupos. A bactéria não foi detectada nos pulmões dos animais imunizados e infectados nos tempos analisados. Portanto, essa formulação é capaz de induzir uma resposta protetora nos animais infectados, sendo portanto, uma promissora plataforma para vacinas contra *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Soroalbumina bovina. Nanopartículas. Vacinas. Inflamação.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic human pathogen that causes severe infections in immunocompromised patients and also in cystic fibrosis patients. The aim of this work was to evaluate the ability of bovine serum albumin nanoparticles with entrapped antigens extracted from *P. aeruginosa* to protect mice from intranasal challenge with this pathogen. Mice were immunized via the subcutaneous route using *P. aeruginosa* antigens, empty nanoparticles or nanoparticles with entrapped *P. aeruginosa* antigens on days 0, 7 and 14. The total IgG antibody production and specific IgG1 and IgG2a titer were measured by ELISA. Immunized mice were challenged with live *P. aeruginosa* and their lungs were collected for histopathology studies and for detection of bacteria in their lungs. Our data showed that NPPa-vaccinated mice presented a high anti-*Pseudomonas* IgG1 and a low IgG2a antibody titles and decreased inflammatory signs, with significant reduction in intensity and concentration of inflammatory cells, lower hemorrhagic, edema and hyperemia signs in the lungs of challenge mice with live *P. aeruginosa* if compared to the other groups. The bacteria was not detected in the lungs from infected mice in the analyzed time. Therefore, this formulation is able to induce a functional response in an animal model of infection and thereby it is a promising platform for *P. aeruginosa* vaccines.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*. Serum Albumin, Bovine. Nanoparticles. Vaccines. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bactéria <i>P. aeruginosa</i> corada através do método de Gram.....	15
Figura 2 - Colônias de <i>P. aeruginosa</i> em ágar.	15
Figura 3 - Análise por SDS-PAGE.....	37
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos de <i>P. aeruginosa</i> produzidas.....	40
Figura 5 - Produção de anticorpos anti- <i>P. aeruginosa</i> em camundongos imunizados	44
Figura 6 - Produção de anticorpos anti-BSA em camundongos imunizados.....	45
Figura 7 - Alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos imunizados e desafiados com <i>P. aeruginosa</i> viva.....	48
Figura 8 - Análise histopatológica dos pulmões de camundongos imunizados com PBS, Pa, NPv e NPPa, 1 e 4 dias após a infecção.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AHL	- Acetil hemoserina lactona
APC	- Célula apresentadora de antígeno
BAFF	- Fator de ativação da célula B
BHI	- Infusão de cérebro e coração
BNP	- Nanopartícula biodegradável
BSA	- Albumina sérica bovina
DC	- Célula dendrítica
ELISA	- Imunoensaio enzimático
ExoU	- Exotoxina bacteriana
FC	- Fibrose cística
HSA	- Albumina sérica humana
IATS	- Esquema Internacional de Tipificação Antigênica
IgG	- Imunoglobulina classe G
IgG1	- Imunoglobulina classe G, subtipo 1
IgG2a	- Imunoglobulina classe G, subtipo 2a
KDa	- Kilodalton
LPS	- Lipopolissacarídeos
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
NPPa	- Nanopartícula associada aos antígenos de <i>P. aeruginosa</i>
NPv	- Nanopartícula vazia
OprF	- Proteína F de membrana externa bacteriana
OprI	- Proteína I de membrana externa bacteriana
Pa	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
PBS	- Solução salina tamponada
PBST	- Solução salina tamponada acrescida de 0,05% de Tween-20
PMA	- Ácido poli-manurônico
SPARC	- Proteína ácida secretada e rica em cisteína
UFC	- Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Características gerais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
2.2	Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.3	Imunoprofilaxia	21
2.4	Nanopartículas	24
2.5	Nanopartículas de albumina	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Cepa bacteriana e extração de proteína	31
4.2	Preparação e caracterização das nanopartículas.....	31
4.3	Protocolo de imunização	32
4.4	Ensaio de ELISA para quantificação de anticorpos IgG anti-BSA	33
4.5	Ensaio de ELISA para quantificação de anticorpos IgG anti- <i>P. aeruginosa</i>	33
4.6	Estudos em animais	34
4.7	Histopatologia.....	34
4.8	Determinação do número de unidades formadoras de colônia no pulmão dos animais infectados	35
4.9	Quantificação da carga microbiana por PCR em Tempo Real.....	35
4.10	Análises estatísticas.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Pseudomonadaceae. Esta bactéria é capaz de infectar diferentes organismos, dentre os quais: leveduras, namatódeos, insetos, plantas e mamíferos, podendo ser encontrada em diversos ambientes, tais como em lagos, rios e solos (MAHAJAN-MIKLOS; RAHME; AUSUBEL, 2000; RAHME et al., 2000). Em humanos, esta bactéria é considerada um patógeno oportunista, sendo uma das principais causadoras de infecções nosocomiais (DIAZ et al., 2008). Estas bactérias podem causar infecções na córnea, no trato urinário, no trato respiratório, na corrente sanguínea, entre outras; sendo a pneumonia nosocomial a maior causa de mortalidade em unidades de tratamento intensivo (OLIVEIRA et al., 2007; LOUIE et al., 2009).

Pseudomonas aeruginosa continua a ser uma importante causa de infecções na sociedade, em parte por causa da sua elevada resistência intrínseca a antibióticos. O total da prevalência de *P. aeruginosa* multi-resistente a antibióticos está aumentando, tornando a resistência a antimicrobianos um problema crescente e limitante das alternativas de tratamento (LUTZ; LEE, 2011).

A compreensão dos principais fatores de virulência e da resposta imune ao patógeno levou ao desenvolvimento de várias medidas imunoterapêuticas para prevenir infecções causadas por *P. aeruginosa*. Muitas formulações, tais como frações sub-celulares, componentes capsulares, proteínas recombinantes e purificadas estão sendo testadas e são candidatos potenciais para o desenvolvimento de vacinas (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Apesar de vários estudos envolvendo potenciais vacinais contra *P. aeruginosa*, não existe, atualmente, no mercado uma vacina aprovada contra a infecção pela bactéria (WORGALL, 2012).

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis são ferramentas promissoras capazes de agir como carreadoras de drogas ou como adjuvantes vacinais (RICE-FICHT et al., 2010). Estas nanoestruturas podem ser facilmente projetadas para permitir a adsorção ou encapsulamento de antígenos e assim representam um novo método para controlar a liberação de imunógenos. As vacinas baseadas em formulações com nanopartículas possuem várias propriedades imunoestimulatórias,

tais como antigenicidade, propriedades adjuvantes e indução de resposta inflamatória (SMITH; SIMON; BAKER JR, 2013; ZAMAN; GOOD; TOTH, 2013). Esta tecnologia também pode ser manipulada para otimizar a resposta imune através de entrega seletiva às células apresentadoras de antígenos (APCs) (KLIPPSTEIN; POZO, 2010).

A albumina é um nanocarreador natural capaz de formar complexos não-covalentes com muitas moléculas sintéticas e naturais. Esta proteína é também biocompatível, biodegradável e atóxica e devido a essas características, nanopartículas de albumina são um bom sistema de entrega de drogas e antígenos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012a). Em estudos prévios, nanopartículas de albumina sérica bovina com *Dengue virus* inativado adsorvido em sua superfície elicitaram uma forte produção de IgG anti-*Dengue virus* em modelo murino (SILVA et al., 2012). Assim, neste estudo nós propomos o uso de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* como um novo modelo vacinal para prevenir a infecção por este patógeno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Pseudomonadaceae. Sua estrutura externa é comum aos Gram-negativos: uma membrana citoplasmática, uma camada de peptidoglicano central e uma membrana externa. Envolvendo essas camadas, encontra-se a cápsula polissacarídica (POLLACK, 2000). A cápsula confere à *P. aeruginosa* proteção contra fagocitose e atividade dos antibióticos, além de possuir a função de ancorar a bactéria às células epiteliais do hospedeiro (MURRAY et al., 2003). É um bacilo que pode se apresentar aos pares, isolados ou em cadeias curtas. A célula bacteriana possui comprimento de 1,5 a 5,0 μm e largura de 0,5 a 1,0 μm (DOGGET, 1979).

O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente que define a membrana externa de *P. aeruginosa*. É composto de lipídeo A, oligossacarídeos centrais e polissacarídeos de cadeias longas periféricas altamente variáveis (antígeno O). O lipídeo A está ancorado na membrana e ligado covalentemente aos oligossacarídeos e polissacarídeos, que se prolongam a partir da superfície da célula (DELUCIA et al., 2011; SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). As diferenças na estrutura química do antígeno O são a base da classificação da espécie diferentes sorotipos heterogêneos (DEAN; GOLDBERG, 2000; BYSTROVA et al., 2006).

A fim de padronizar os resultados decorrentes dos diferentes sistemas de sorotipagem, Liu e colaboradores (1983) organizaram um encontro entre especialistas de sorotipagem de *P. aeruginosa*, com a iniciativa de dar origem a uma classificação padronizada de sorotipos chamada de Esquema Internacional de Tipificação Antigênica (IATS), que tinha 17 sorotipos. Um estudo subsequente adicionou mais 3, totalizando 20 sorotipos para *P. aeruginosa* (LAM et al., 2011).

A presença ou ausência de cadeias externas de polissacarídeo O determina fenótipos lisos ou rugosos das colônias bacterianas. A forma lisa de *P. aeruginosa* é associada com a maior virulência, particularmente em infecções sistêmicas e agudas, enquanto as formas rugosas são geralmente isoladas dos pulmões de pacientes com FC cronicamente infectados (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011).

O esquema de sorotipagem IATS tem sido geralmente eficaz para a classificação de cepas de *P. aeruginosa* de fenótipo liso que possuem os três domínios (lipídeo A, oligossacarídeos centrais e antígenos O). Porém, em muitos casos clínicos, essa sorotipagem não tem sido tão eficaz, já que muitos isolados são parcialmente deficientes ou completamente desprovidos de antígeno O. A sorotipagem dos isolados bacterianos de pacientes com FC crônica é complicada, uma vez que uma proporção muito elevada destas bactérias não é tipificável (LAM et al., 2011). A utilização de anticorpos monoclonais pode ser mais específica e precisa do que anticorpos policlonais em atribuir uma designação específica para o sorotipo de muitos isolados de *P. aeruginosa*. No entanto, para classificar cepas que tenham sido classificadas como não tipificáveis por sorotipagem é necessária a utilização de técnicas moleculares ao invés das sorológicas (DASGUPTA et al., 1994).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria móvel e esta mobilidade é atribuída a um único flagelo polar que promove a natação em ambientes líquidos, e a um tipo polar de pili IV responsável pelo movimento rápido sobre superfícies sólidas. Também apresentam mobilidade em superfícies semi-sólidas na presença de fontes específicas de carbono e nitrogênio (KÖHLER et al., 2000; DASGUPTA et al., 2003). Crescem em temperatura ótima de 37 a 42°C e em condições aeróbicas; no entanto, são capazes de crescer em condições anaeróbicas, sendo o nitrato o acceptor alternativo de elétrons (WORLITZSCH et al., 2002).

A identificação da *P. aeruginosa* se baseia na visualização de bacilos Gram-negativos não esporulados após a coloração de Gram (Figura 1) e pelo uso de procedimentos bioquímicos. A bactéria pode ser identificada através da pigmentação, uma vez que produz pioverdina, pigmento fluorescente e piocianina, pigmento azulado. Além disso, podem ser identificadas pela forma da colônia (Figura 2), pela capacidade de metabolizar o citrato e oxidar a glicose, não sendo capaz de fermentação de carboidratos (GABY; HADLEY, 1957; POLLACK, 2000).



Figura 1 - Bactéria *P. aeruginosa* corada através do método de Gram.
Fonte: Todar's Online Textbook of Bacteriology.



Figura 2 - Colônias de *P. aeruginosa* em ágar.
Fonte: Todar's Online Textbook of Bacteriology.

O genoma da *P. aeruginosa* consiste em um cromossomo único e circular, sendo um dos maiores entre bactérias, com aproximadamente 6,3 Mega pares de base (STOVER et al., 2000). Aproximadamente 90% do genoma de *P. aeruginosa* é conservado (WOLFGANG et al., 2003). Porém, algumas cepas possuem ilhas genômicas inseridas no cromossomo (SCHMIDT; TÜMMLER; RÖMLING, 1996). Estas ilhas genômicas são segmentos de DNA frequentemente inseridos adjacentes a genes de RNA transportador (tRNA), possuindo uma proporção de GC diferente do

restante do cromossomo. Essas ilhas possuem componentes de elementos genéticos móveis e são adquiridas por transferência horizontal, o que torna difícil atribuir suas origens iniciais (REITER; PALM; YEATS, 1989; HE et al., 2004; LAWRENCE, 2005). As ilhas genômicas codificam uma variedade de proteínas com funções simbióticas e envolvidas na patogênese da bactéria, podendo contribuir para a capacidade de *P. aeruginosa* de habitar diversos ambientes (SPENCER et al., 2003; SHEN et al., 2006).

2.2 Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa têm a capacidade de infectar diferentes organismos, entre eles: leveduras, nematódeos, insetos, plantas e mamíferos, podendo ser encontrada em diversos ambientes, tais como lagos, rios ou solos (MAHAJAN-MIKLOS; RAHME; AUSUBEL, 2000; RAHME et al., 2000).

Este patógeno tem grande importância na veterinária. É frequentemente encontrado no prepúcio e no sêmen do touro, podendo causar doença genital grave na inseminação artificial e prejudicar a capacidade funcional dos espermatozoides *in vitro* (EAGLESOME; GARCIO; BIELANSKI, 1995). Também pode causar doenças venéreas e infertilidade em cavalos (TAZUMI et al., 2009; GUIMARÃES; CARVALHEIRA; ROCHA, 2012). A bactéria tem prejudicado o mercado de peixes, devido às ulcerações cutâneas causadas por *P. aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamases (KHAIRNAR et al., 2013). Nos animais domésticos, o agente tem sido descrito em diferentes afecções, incluindo otites (externas, médias e internas), conjuntivite, dermatite, abscessos, pústulas intradérmicas, pneumonia, enterite, gastroenterite, úlceras orais e cutâneas, septicemia, endometrite, aborto e morte súbita (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2000; PETERMANN et al., 2001; WIDEMAN, 2006; HIRAKAWA et al., 2010; GUIMARÃES; CARVALHEIRA; ROCHA, 2012; HARADA et al., 2012).

Em humanos, é considerado um patógeno oportunista, sendo um dos principais causadores de infecções nosocomiais, uma vez que pode ser propagado pelo ambiente hospitalar através das mãos dos trabalhadores de saúde ou por

outras fontes de transmissão, tal como água contaminada (DIAZ et al., 2008; SILVA et al., 2008).

A fácil adaptação às condições ambientais de nutrição, temperatura e umidade e sua capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos; bem como a possibilidade de sobreviver por períodos prolongados em ambientes úmidos, tais como equipamentos e utensílios hospitalares, soluções anti-sépticas, desinfetantes e de uso terapêutico, são fatores determinantes da alta incidência desse patógeno nas infecções hospitalares (FAVERO et al., 1971; GRUNDMANN et al., 1995; MOOLENAR et al., 2000).

A infecção por *P. aeruginosa* é crítica em pacientes hospitalizados, principalmente imunodeficientes, portadores de câncer e que necessitam de ventilação mecânica. Podem ocorrer infecções na córnea, no trato urinário, no trato respiratório, na corrente sanguínea, entre outras; sendo que a pneumonia nosocomial é a maior causa de mortalidade em unidades de tratamento intensivo (OLIVEIRA et al., 2007; LOUIE et al., 2009).

A alta incidência de morte por essa infecção deve-se à resistência da *P. aeruginosa* às drogas utilizadas. Sugere-se que *P. aeruginosa* é capaz de desenvolver uma potente virulência que neutraliza a resposta do sistema imune, justificando a persistência da infecção bacteriana. Esses fatores de virulência podem ser associados com a secreção de uma potente toxina – exoenzima U (ExoU) diretamente nas células do hospedeiro. Essa toxina induz eventos citolíticos e intoxicação celular via ativação da fosfolipase A₂. Esse mecanismo de virulência contribui para a forma aguda da pneumonia (FINCK-BARBAÇON et al., 1997; HAUSER; KANG; ENGEL, 1998; PHILLIPS et al., 2003). Diaz e colaboradores (2008) mostraram, em seu estudo de pneumonia aguda em modelo murino, que a presença de *P. aeruginosa* no pulmão dos animais causa o recrutamento de células fagocíticas. Porém, a liberação de ExoU por esta bactéria inibe estas células fagocíticas de eliminar o patógeno em questão.

A FC também se constitui uma importante doença relacionada à infecção pela *P. aeruginosa*. A FC é hereditária, causada por mutações no gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística que leva à ausência de uma proteína transmembrânica das células epiteliais. A ausência dessa proteína causa a interrupção do transporte de íons e a desidratação da superfície de mucosas (ZEMANICK et al., 2010). É caracterizada por inflamação no pulmão, em parte pela

infecção crônica por *P. aeruginosa*. Pacientes hospitalizados portadores de FC são infectados com essa bactéria nos estágios iniciais da doença, sendo esta infecção a maior causa de mortalidade nesses pacientes (WEIMER et al., 2009).

Pacientes com FC são incapazes de eliminar a infecção pulmonar crônica causada pela bactéria apesar de uma resposta celular e humoral, caracterizada pelo acúmulo de granulócitos, secreção de peptídeos antimicrobianos, lisozima e lactoferrina. A dificuldade de eliminação da bactéria existe mesmo na presença de tratamento antibiótico intensivo. *P. aeruginosa* desenvolveu diversos mecanismos para escapar das respostas imunológicas, entre esses mecanismos estão: a formação de biofilmes, uma capacidade intrínseca para desenvolver resistência a antibióticos e a liberação de um grande número de fatores de virulência, tais como alginato, elastase, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzimas e exotoxinas (HARTL et al., 2006).

Apesar de ter sido considerada um patógeno extracelular, estudos mostraram que *P. aeruginosa* possui a capacidade de invadir e sobreviver dentro das células epiteliais da córnea (LEDBETTER et al., 2009). Assim, estas bactérias podem causar infecções nesse tecido, principalmente em indivíduos que utilizam lentes de contato. A progressão da infecção é rápida e pode causar perda de visão (ZAIDI; PRIEBE; PIER, 2006). *P. aeruginosa* também está relacionada com um crescente problema que vem atraindo cada vez mais a atenção nas últimas décadas, a endocardite polimicrobiana (DAAS; ABUHMAID; ZERVOS, 2009).

Informações sobre os patógenos envolvidos em casos de infecção hospitalar são importantes, e para tal existem sistemas de vigilância para esta monitorização. Em 1996, o Sistema Nacional de Vigilância de Infecção Hospitalar (NNIS), conduzido pelo programa de infecções hospitalares do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), nos Estados Unidos descreveu *P. aeruginosa* como a principal causa de infecção hospitalar dentre todos os patógenos relacionados com a pneumonia em Unidades de Terapia Intensiva (RICHARDS et al. 1999). A *P. aeruginosa* apareceu ainda, como o 4º agente de infecção de sítio cirúrgico, o 5º de infecções hospitalares em geral e o 6º de infecções da corrente sanguínea (NNISS, 1996). O sistema SENTRY – Programa de Vigilância da Resistência Antimicrobiana - fornece dados sobre a ocorrência de *P. aeruginosa* em infecções hospitalares. Entre 70.067 isolados obtidos de pacientes internados em hospitais em cinco áreas geográficas diferentes do mundo e avaliados pelo SENTRY (1997-1998), as taxas

de prevalência de infecções por *P. aeruginosa* foram maiores nas regiões da América Latina e da Ásia-Pacífico (11,4% do total de isolados em cada região) que na Europa (9,3%), nos Estados Unidos (8,7%), e no Canadá (8,6%) (GALES et al., 2001).

Estes dados se repetiram com estudos de Gales e Jones (2002), Gaynes e Edwards (2005) e Kollef e colaboradores (2005), os quais também citaram a bactéria como o principal microorganismo causador de pneumonia em pacientes hospitalizados na América Latina, sendo que a maioria das cepas isoladas possuía resistência à grande parte dos antimicrobianos testados. Outro sistema de vigilância, o 'Coleta de Informações sobre Teste de Susceptibilidade Anual de Meropenem' (MYSTIC), monitora a suscetibilidade a carbapenêmicos e outros antimicrobianos em hospitais (MENDES et al., 2000). A avaliação de 20 hospitais brasileiros em 2003 por esse sistema mostrou que *P. aeruginosa* era o Gram negativo mais frequentemente isolado em hospitais (KIFFER et al., 2005).

Estudos indicam que *P. aeruginosa* continua sendo um patógeno frequentemente isolado no Brasil e em todo o mundo. No Brasil, dados do SENTRY de 2008 a 2010, mostram que *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia hospitalar, segunda causa de infecção de ferida e o terceiro patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea (GALES et al., 2012). Dados do SENTRY, de janeiro de 2009 a dezembro de 2012, mostraram também que *P. aeruginosa* foi o Gram-negativo mais freqüentemente isolado de pacientes hospitalizados com pneumonia nos Estados Unidos (28 centros médicos) e em regiões da Europa e do Mediterrâneo (25 centros médicos) (SADER et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa continua a ser uma importante causa de infecções na sociedade, em parte por causa da sua elevada resistência intrínseca a antibióticos (HANCOCK; SPEERT, 2000). Fluoroquinolonas, tais como a ciprofloxacino e levofloxacino são amplamente utilizadas no tratamento de infecções crônicas e agudas causadas por *P. aeruginosa*. No entanto, a eficácia destes antibióticos pode ser comprometida pelo surgimento de mutantes resistentes que exibem alterações em alvos de drogas ou mecanismos de superprodução de efluxo de drogas (LLANES et al., 2011).

O total da prevalência de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos está aumentando, com até 10% de isolados globais multi-resistentes. Um estudo em Ohio

- Estados Unidos indicou que *P. aeruginosa* ambiental tem níveis consideráveis de resistência a antibióticos. Isolados clínicos também demonstraram resistência a uma vasta gama de agentes antimicrobianos clinicamente relevantes, incluindo aztreonam (22%), gentamicina (9%), imipenem (26%), amicacina (9%), meropenem (4%) e tobramicina (9%). Resistência também foi notada em agentes alternativos, como ceftriaxona (4% resistente, 30% intermediário), ticarcilina/ácido clavulânico (4%), e trimetoprim/sulfametoxazol (13% resistentes, 17% intermediário) (LUTZ; LEE, 2011).

Pseudomonas aeruginosa tem sido a causa de surtos nosocomiais em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde a resistência a múltiplas drogas é comum entre essas cepas (ROSSI, 2011). Entre os Gram-negativos, *P. aeruginosa* demonstra maior facilidade de desenvolvimento de resistência aos antibióticos (FIGUEIREDO et al., 2007). Em um estudo realizado num hospital universitário público do noroeste do Paraná (SIQUEIRA et al., 2013), foram encontrados um total de 75 isolados de *P. aeruginosa*, sendo que a maior freqüência foi em pacientes do sexo masculino (62,7%), especialmente em pacientes com mais de 60 anos (54,7%) e em UTI (41,4%). Destes 75 isolados, 54,6% eram multirresistentes.

Para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com queimaduras são usados carbapenêmicos, principalmente imipenem (SADERI et al., 2010). Entretanto, o isolamento de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos tem sido cada vez mais frequente nos hospitais brasileiros. Scheffer e colaboradores (2010) realizaram um estudo no hospital universitário em Florianópolis, Santa Catarina. *P. aeruginosa* foi um dos principais patógenos envolvidos em infecção hospitalar durante o período do estudo. Carbapenêmicos foram considerados uma excelente opção terapêutica para o tratamento destas infecções, no entanto, o aumento da resistência a estes agentes verificado na instituição (13% em 2003, 32% em 2004 e 44% em 2005), foi preocupante. Os resultados mostraram a propagação de um clone com alto nível de resistência, o que sugere a transmissão cruzada como um importante mecanismo de disseminação e tem contribuído para o aumento nos níveis de resistência aos carbapenêmicos.

Jácome e colaboradores (2012) realizaram um estudo com sessenta e uma amostras clínicas de isolados de *P. aeruginosa* de cinco hospitais públicos da cidade do Recife, Pernambuco. Os dados mostraram uma elevada percentagem de fatores de virulência (34,4% colônias mucóides; 70,5% produtores de piocianina; 93,4%

gelatinase-positivos e 72,1% hemolisina-positivos) e uma elevada percentagem de taxas de resistência antimicrobiana (4,9% pan resistentes e 54,1% multiresistente). Entre os 29 isolados resistentes a imipenem e/ou ceftazidima, 44,8% eram produtores de metalo-beta-lactamases.

2.3 Imunoprofilaxia

Ao penetrar no organismo, *P. aeruginosa* causa uma resposta imunológica caracterizada pela presença de células mononucleares, produção de citocinas (como por exemplo: fator de necrose tumoral alfa, interleucina 2 e interferon gama) e anticorpos. Dentre os fatores de virulência que promovem a infecção estão a secreção de proteases e elastases que degradam os componentes do sistema complemento, o que por sua vez dificulta a resposta imune contra o patógeno. Exemplos dessas substâncias são a exotoxina A, a exoenzima S e algumas fosfolipases (MANAFI et al., 2009). A bactéria também possui LPS que interfere com a deposição de C3_b, um fator importante na resposta imune (WEIMER et al., 2009). Apesar de existirem estudos envolvendo potenciais candidatos vacinais contra *P. aeruginosa*, não existe, atualmente, no mercado uma vacina aprovada (WORGALL, 2012).

Levando-se em consideração a resposta imunológica do hospedeiro e os fatores de virulência do patógeno, estudos vêm sendo realizados com o propósito de desenvolver imunoterapias para prevenir a infecção causada pela *P. aeruginosa*. Segundo Manafi e colaboradores (2009), a exotoxina A - produto extracelular e principal fator letal de *P. aeruginosa*, pode ser uma potente estratégia vacinal. Os resultados da pesquisa destes autores mostraram que esta exotoxina semi-inativada induz uma proteção efetiva de 93,8% e diminui a incidência de morte dos camundongos infectados.

Horzempa e colaboradores (2008) realizaram estudos com outra importante estratégia vacinal – a síntese de glicoconjugados, utilizando-se como componente o antígeno O. Este é um polissacarídeo de superfície de membrana da maioria das bactérias Gram-negativas. Este polissacarídeo é um dos antígenos em que os anticorpos se ligam para combater a infecção (WORGALL et al., 2007). Segundo os

pesquisadores, os anticorpos contra esse antígeno têm mostrado proteção contra a infecção causada por *P. aeruginosa*, uma vez que a bactéria possui proteínas ligadas ao antígeno O.

Scarff e Goldberg (2008) realizaram um estudo com um sorotipo de *Salmonella enterica* atenuada expressando o antígeno O de *P. aeruginosa*. Camundongos foram imunizados via intranasal e desafiados com uma dose cinco vezes maior que a dose letal para 50 por cento da população. Os resultados demonstraram que os animais imunizados apresentaram proteção completa após serem desafiados, sendo essa formulação um tratamento em potencial para indivíduos imunocomprometidos.

Outro componente com potencial vacinal é a proteína F (OprF), localizada na superfície da membrana externa da bactéria. Essa proteína é antigenicamente conservada em alguns tipos de *P. aeruginosa*. Anticorpos contra OprF são associados com a proteção de modelos animais contra infecções causadas por *P. aeruginosa*. Worgall e colaboradores (2007) sugerem que adenovírus deficientes na replicação são vetores atraentes para uma vacina contra infecções pulmonares causadas por *P. aeruginosa*. Eles estudaram um capsídeo modificado de um vetor adenovírus (AdOprF.RGD.Epi8) expressando o gene para OprF e observaram a indução de uma imunidade protetora contra o patógeno em questão.

Baumann e colaboradores (2007) também estudaram a proteína OprF como potencial vacinal contra *P. aeruginosa*. Eles utilizaram a imunização nasal com antígenos recombinantes de OprF e proteína I de membrana externa (OprI) de *P. aeruginosa*. Esta imunização levou a uma resposta de anticorpos duradoura no soro e nas vias respiratórias inferiores. Em 2011, Krause e colaboradores também utilizaram adenovírus expressando OprF (AdC7OprF) na imunização de camundongos. Esta induziu resposta imune celular e humoral, porém, segundo os autores, mais estudos são necessários.

Um estudo, realizado na Austrália por Cripps e colaboradores (2006), utilizou cápsulas de gelatina contendo 150 mg de *P. aeruginosa* inativada por formaldeído e liofilizada para imunização via oral de voluntários portadores de FC. Os resultados do estudo mostraram a presença de anticorpos contra OprF e OprI de *P. aeruginosa* no soro dos indivíduos imunizados. Também foi demonstrado um aumento da habilidade fagocítica de macrófagos após a vacinação e um aumento significativo de

morte de *P. aeruginosa* opsonizada por esses macrófagos. Porém, são necessários outros estudos para determinar a dosagem apropriada e a eficácia necessária.

Em 2007, Döring e colaboradores imunizaram pacientes com FC colonizados com *P. aeruginosa* utilizando uma vacina bivalente contendo alguns dos subtipos de antígenos flagelares (a_0 , a_1 , a_2 e b). A vacina foi bem tolerada e os pacientes desenvolveram altos títulos de IgG anti-*Pseudomonas* comparado com o grupo placebo.

Uma outra alternativa explorada foi o uso do fator de ativação da célula B (BAFF), uma potente citocina que estimula os efeitos das células B e T, componentes essenciais na resposta imunológica contra o patógeno. Com isso, a super expressão de BAFF pode aumentar a imunidade humoral, e assim ser usado na confecção de vacinas para induzir produção de anticorpos. O resultado de um estudo realizado com camundongos sugere que o BAFF é uma citocina promissora para o desenvolvimento de vacinas contra *P. aeruginosa* (TERTILT et al., 2009).

N-acil Homoserina Lactonas (AHLs) são produzidas por mais de 70 espécies de bactérias Gram-negativas e *P. aeruginosa* utiliza *quorum sensing* baseados em AHL para controlar a expressão de fatores de virulência e formação de biofilmes. N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo- C_{12} -HSL) é uma AHL que promove especificamente a indução de apoptose em macrófagos e neutrófilos. Miyairi e colaboradores (2006) utilizaram um anticorpo monoclonal como opção terapêutica para combater infecções provocadas por *P. aeruginosa*. O anticorpo usado foi gerado contra um hapteno análogo de 3-oxo- C_{12} -HSL. O estudo demonstrou que o anticorpo em questão foi capaz de proteger os macrófagos derivados da medula óssea de camundongo da apoptose induzida por 3-oxo- C_{12} -HSL.

Miyairi e colaboradores (2006) também demonstraram efeito protetor de anticorpos específicos para 3-oxo- C_{12} -HSL na infecção aguda por *P. aeruginosa*. Os pesquisadores imunizaram camundongos com o conjugado BSA-3-oxo- C_{12} -HSL e observaram maior sobrevivência, menores níveis de fator de necrose tumoral alfa nos pulmões e reduzidos níveis de 3-oxo- C_{12} -HSL no soro e nos pulmões dos camundongos imunizados em comparação com os controles.

A colonização do pulmão de pacientes com FC por *P. aeruginosa* ocorre no início da vida predominantemente por cepas móveis, expressando um único flagelo polar, com baixa produção de alginato e não mucóides. Alginato desempenha muitos papéis na patogênese da infecção do trato respiratório na FC. Ele serve como um

mecanismo de formação de biofilmes, confere propriedades antifagocíticas para cepas mucóides e protege *P. aeruginosa* das conseqüências da inflamação, tais como os radicais livres. A maior parte do alginato é composto por blocos de ácido poli-manurônico O-acetilado (PMA), o que sugere que uma preparação de alginato rica em resíduos de PMA poderia induzir anticorpos amplamente reativos. Componentes dos flagelos de *P. aeruginosa*, assim como a flagelina também estão envolvidos na adesão de tecidos do hospedeiro. Em um estudo, Campodónico e colaboradores (2011) demonstraram que a síntese de um conjugado ácido poli-manurônico-flagelina (PMA-FLA) induziu altos títulos de anticorpos específicos de PMA e flagelina que foram capazes de proteger camundongos contra cepas mucóides e não mucóides de *P. aeruginosa*. No entanto, pode ser necessário incluir outros tipos de flagelina de *P. aeruginosa* em uma futura preparação da vacina.

Em 2011, Kamei e colaboradores demonstraram que uma imunização de mucosa com uma vacina multivalente de *P. aeruginosa* viva atenuada induz imunidade multifatorial, envolvendo anticorpos, assim como células T. Esta imunidade multifatorial foi associada com ampla proteção *in vivo* contra a infecção pulmonar aguda fatal causada por uma variedade de cepas de *P. aeruginosa*.

2.4 Nanopartículas

Nanopartículas são materiais que têm dimensões nanométricas. Estas são compostas por uma matriz coloidal sólida, podendo ser utilizada como carreador (MURTHY, 2007). Há uma variedade de nanopartículas desenvolvidas, para uma variedade de funções (OLIVER, 2005). Micelas, lipossomos, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas compostas de polímeros biodegradáveis, nanocristais, dendrímeros e nanotubos têm sido usados como estratégia para entrega de fármacos convencionais ou substâncias como peptídeos, proteínas recombinantes, vacinas e nucleotídeos (DAI et al., 2006; KOMMAREDDY; AMIJI, 2007; LIANG et al., 2008; MARCATO; DURÁN, 2008; BUONO et al., 2009; PATIL; PANYAM, 2009).

Atualmente esses materiais em nanoescala têm desempenhado importantes papéis na medicina moderna. Devido ao seu tamanho, têm propriedades que nenhum outro material possui, tais como reatividade química, absorção de energia e

movilidade biológica. As nanopartículas são usadas para imagem óptica, ressonância magnética, carrear moléculas biológicas (incluindo enzimas, proteínas recombinantes e ácidos nucleicos), detecção de câncer, engenharia de tecidos e várias terapias para doenças neurodegenerativas, câncer, HIV, doenças oculares e respiratórias, diabetes, alergia, infecção e inflamação (ROY et al., 1999; FURNO et al., 2004; MURTHY, 2007; BASARKAR; SINGH, 2009; WILSON et al., 2010; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2012).

As nanopartículas têm sido utilizadas na aplicação terapêutica. Algumas das características destas partículas que contribuem para isto são: grandes áreas superficiais que podem exibir um grande número de grupos funcionais, tais como ligantes; rápida absorção; elevada capacidade de difusão e adaptação/controla dos tamanhos das partículas e características de superfície (NITTA; NUMATA, 2013).

Nanopartículas poliméricas, principalmente as biodegradáveis, estão sendo muito utilizadas como carreadoras de fármacos e outras substâncias (PATIL; PANYAM, 2009). Biopolímeros são polímeros que são produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, que são classificados em três grupos: polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Exemplos de biopolímeros que podem ser usados na fabricação de nanopartículas biocompatíveis são: proteínas (seda, colágeno, gelatina, β -caseína e albumina) e polissacarídeos (quitosano, alginato, amido e heparina). Ao passo que, polímeros biodegradáveis são aqueles que, por ação de organismos vivos, são decompostos, pelo menos parcialmente (NITTA; NUMATA, 2013).

Nanopartículas poliméricas fornecem a possibilidade de transportar compostos bioativos para tecidos, células e compartimentos celulares específicos através da modificação da sua superfície (YANG et al., 2006). Comparado com nanopartículas de metal, nanopartículas poliméricas podem ser fabricadas numa vasta gama de tamanhos e podem manter o agente terapêutico no local de interesse por semanas (YIH; AL-FANDI, 2006). Elas também apresentam diversos mecanismos de carregamento de drogas, incluindo atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligação covalente. Em comparação a polímeros sintéticos, as nanopartículas compostas de proteínas oferecem a vantagem de serem metabolizáveis por enzimas digestivas em peptídeos inócuos ao passo que os polímeros sintéticos podem acumular-se no corpo e resultar em produtos de degradação tóxicos (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012b). Além disso,

nanopartículas à base de proteínas oferecem várias possibilidades de modificação da superfície, devido à presença de grupos funcionais, permitindo o direcionamento do fármaco específico para o local de ação (NITTA; NUMATA, 2013).

Nanopartículas poliméricas, especialmente as biodegradáveis, representam um aperfeiçoamento no método tradicional de administração de drogas em termos de eficiência e eficácia, podendo aumentar a estabilidade de drogas ou proteínas. Nanopartículas biodegradáveis (BNPs) podem ser específicas para entrega de altas concentrações do fármaco a um local desejado. A encapsulação, absorção, biodistribuição, eliminação e a liberação da droga são dependentes de vários fatores, incluindo a composição do polímero, hidrofobicidade, carga de superfície, biodegradação, substâncias adjuvantes e associação com drogas. A habilidade para liberação de drogas tem feito das nanopartículas poliméricas candidatas ideais para terapia de câncer, entrega de vacinas, contraceptivos e antibióticos no sítio alvo (MARCATO; DURÁN, 2008).

As BNPs foram desenvolvidas como uma estratégia para a administração de drogas e biomacromoléculas (DNA e proteínas) (DOBROVOLSKAIA et al., 2008; MARCATO; DURÁN, 2008). BNPs associados à antígenos ou com antígenos encapsulados representam, atualmente, uma estratégia interessante para a liberação de antígenos imunogênicos com consequente otimização da ativação do sistema imune. Isto é possível, principalmente, através da ativação e diferenciação das células dendríticas (DC) por estas BNPs. Além da atividade adjuvante na indução da maturação das DC, elas são sistemas promissores para o encaminhamento de antígenos aos linfonodos após uma administração subcutânea devido ao seu tamanho diminuto. Assim, a vacinação com BNPs associadas à antígenos podem maximizar a ativação da imunidade celular e/ou humoral induzida por estes antígenos (REDDY; SWARTZ; HUBBELL, 2006; ELAMANCHILI et al., 2007; MANOLOVA et al., 2008; OYEWUMI et al., 2010; SAHDEV; OCHYL; MOON, 2014).

As nanopartículas também podem induzir a ativação do complemento. Esta ativação do sistema complemento fornece um suporte para a resposta de células do sistema imune, tais como células dendríticas, linfócitos B e T. A ativação local do complemento pelas nanopartículas pode ser desejável por aumentar a apresentação de antígenos, aumentando assim a eficácia vacinal quando as nanopartículas são

administradas pelas vias subcutânea ou intradérmica (DOBROVOLSKAIA et al; 2008).

Em caso de aplicações biomédicas, nanopartículas podem ser introduzidas através das vias intravenosa, intraperitonal, intramuscular, subcutânea, cutânea, oral ou intraocular (KONG et al., 2011). A administração subcutânea é a via mais apropriada para entrega de antígenos uma vez que estes podem ser drenados para os linfonodos onde os linfócitos residem, sendo, portanto, a administração de nanopartículas pela via subcutânea a mais eficaz para a maioria dos antígenos (PITAKSUTTEEPONG, 2005).

Ao contrário das vacinas convencionais, que utilizam microrganismos inteiros (vivos ou mortos), a nova geração de vacinas utiliza componentes de microorganismos para induzir uma resposta imune e imitar a forma em que estes antígenos seriam entregues durante uma infecção natural. Muitas vezes, estes antígenos não são bons imunógenos por si só e, portanto, exigem um adjuvante para aumentar a resposta imune. Nanopartículas constituem um método alternativo de entrega de antígenos, as quais não somente ativam diferentes elementos do sistema imune, mas também possuem boa biocompatibilidade. O tamanho das nanopartículas e a entrega de antígenos em diferentes vias (subcutânea, oral, etc) exercem influência na resposta imune. (GREGORY; TITBALL; WILLIAMSON, 2013).

2.5 Nanopartículas de albumina

Albumina é uma proteína plasmática com um peso molecular de 66,5 kDa. Ela é estável em pH entre 4 a 9, solúvel em 40% etanol e pode ser aquecida a 60°C por até dez horas sem efeitos deletérios. Estas propriedades, bem como a biodegradabilidade e ausência de toxicidade fazem da albumina sérica um candidato ideal para entrega de drogas. Albumina também possui alto valor nutricional, alta estabilidade, capacidade de ligação a vários fármacos, capacidade de emulsificação, gelificação e ligação com água, além de ficar circulante no sangue por aproximadamente 19 dias (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012a). Recentes aplicações de albumina sérica (humana ou

bovina) têm demonstrado algumas vantagens como carreador de drogas biocompatível e biodegradável (ZHAO et al., 2010).

Albumina tem sido uma das primeiras moléculas de escolha em sistemas carreadores de fármacos e foi uma das primeiras nanopartículas aprovadas pela agência de Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (USFDA) (ZHAO et al., 2010; PARK, 2012). Estudos recentes mostram que nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) são boas carreadoras de drogas, liberando os medicamentos conjugados nos locais de interesse e aumentando a concentração da droga no tecido (GRADISHAR et al., 2005; RAHIMNEJAD; JAHANSHAH; NAJAFPOUR, 2006; LI et al., 2008; DASGUPTA; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2009; ZU et al., 2009; ZHAO et al., 2010). BSA tem sido utilizada para preparação de nanopartículas devido a sua estrutura primária bem definida em conjunto com a vantagem de permitir a modificação da sua superfície. A proteína oferece vários locais alvo para modificação covalente, tais como grupos amino livres. Além disso, a técnica de preparo das nanopartículas de BSA já está bem estabelecida (KOUCHAKZADEH et al., 2010).

Um estudo realizado com nanopartículas de BSA contendo os quatro sorotipos de *Dengue virus* (DENV) adsorvidos à sua superfície demonstrou que esta formulação induz a produção de anticorpos IgG anti-DENV, porém outros estudos devem ser realizados para melhorar a imunogenicidade, a especificidade da resposta imune e a atividade funcional para fazer desta plataforma uma opção viável para vacinas contra DENV (SILVA et al., 2012).

A preparação de partículas de albumina de tamanho uniforme tem sido relatada desde 1970. Os principais procedimentos utilizados para preparar nanopartículas à base de albumina são a coacervação (HEDAYATI; JAHANSHAH; ATTAR, 2012), a dessolvatação controlada (WEBER et al., 2000; MEHRAVAR; SAGHATOLESLAMI, 2009), a gelificação térmica, a formação de emulsão (MÜLLER et al., 1996) e a auto-montagem (XU; FISHER; JULIANO, 2011). As principais estratégias para a utilização de nanopartículas de albumina como carreadoras de drogas são: acoplamento de substâncias de baixo peso molecular, conjugação com proteínas bioativas e encapsulamento de fármacos (KRATZ, 2008).

Nanopartículas de BSA possuem muitas características desejáveis, dentre as quais: presença de um núcleo hidrofóbico facilitando a entrega de fármacos de mesma propriedade, abundância natural no plasma, estabilidade relativa,

disponibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade (JI et al., 2012; YOGASUNDARAM et al., 2012).

A albumina sérica humana (HSA) é uma das proteínas mais abundantes presentes no plasma sanguíneo, o que pode indicar que muitos compostos metabólicos e agentes terapêuticos são transportados por HSA. Esta proteína é capaz de se ligar a gp60 e à proteína ácida secretada e rica em cisteína (SPARC). Gp60 é uma proteína encontrada na membrana plasmática endotelial envolvida no fluxo de albumina através da barreira endotelial (MALIK, 2009). SPARC é uma proteína de matriz extracelular expressa em muitos tumores avançados (SHI et al., 2004). A ligação a gp60 e SPARC permite que a HSA se acumule em tumores e tecidos inflamatórios (ELSADEK; KRATZ, 2012; PARK, 2012).

Nanopartículas carreadoras de fármacos à base de albumina, obtidas através do processo de coacervação já foram descritos (MARTÍNEZ et al., 2012). Células MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano) e células HeLa (células de câncer cervical humano) são capazes de captar nanopartículas de albumina, e quando polissacarídeos são usados na composição da partícula, observa-se uma melhor interação destas partículas com as células. Nanopartículas de albumina conjugada também têm sido desenvolvidas como uma nova tecnologia de sistemas de entrega de fármacos anti-câncer (American Bioscience, Inc). Partículas de albumina com paclitaxel (nab-paclitaxel, 100-200nm) foram aprovadas em 2006 para uso em pacientes com câncer de mama metastático, devido à sua eficácia antitumoral superior sobre paclitaxel. A elevada eficácia de partículas de albumina conjugadas a paclitaxel deve-se à acumulação intratumoral mais eficaz do fármaco (DESAI et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imunológica humoral de camundongos Swiss imunizados com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa*.

3.2 Objetivos específicos

1. Obter antígenos totais de *P. aeruginosa*;
2. Produzir nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa*;
3. Avaliar e quantificar a produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa* em camundongos imunizados com as nanopartículas associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa*;
4. Avaliar a capacidade da imunização de induzir proteção contra infecção experimental com *P. aeruginosa*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepa bacteriana e extração de proteína

A bactéria *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foi gentilmente doada pela Professora Doutora Luciene Andrade da Rocha Minarini do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Alfenas. Esta é uma cepa de *P. aeruginosa* isolada de cultura de sangue em Boston em 1971 (ATCC, 2014). A bactéria foi cultivada em caldo infusão de cérebro e coração (*Brain heart infusion*-meio BHI), à temperatura de 37°C por 24 horas.

Para o cultivo da bactéria, 1 mL de cultura congelada de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) em 20% de glicerol foi inoculado em 50 mL de meio BHI e incubado por 16-24 horas a 37°C. A cultura foi transferida para um tubo de 15 mL estéril e centrifugada a 2.000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi então ressuspendido em 10 mL de tampão salina tamponada (PBS) e centrifugado a 2.000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento congelado a -20°C até a extração das proteínas. Para a extração, o sedimento foi lisado em gelo por 30 minutos usando 1,25 mL de tampão de lise estéril (10 mM Tris HCL ph 8,0; 150 mM NaCl; 0,5% Triton X-100) contendo 0,5 mM do inibidor de protease Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). O lisado foi então centrifugado a 13.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford usando o kit Bio-Rad assay. As proteínas totais de *P. aeruginosa* foram separadas por gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e corados pelo método do nitrato de prata.

4.2 Preparação e caracterização das nanopartículas

Para produzir nanopartículas com os antígenos encapsulados, 500 µg de antígenos totais extraídos de *P. aeruginosa* foram incubados com 2 mL de solução

aquosa de BSA (2% m/v) por 30 minutos sob agitação à 25°C. Após esta primeira etapa, a etapa de coacervação foi realizada adicionando-se etanol gota a gota (etanol:água relação 1,5:1) em constante agitação. A fim de estabilizar os coacervados, a reticulação foi realizada adicionando 50 µL de glutaraldeído a 25%. A solução foi deixada em agitação constante durante 2 horas à 25°C. As nanopartículas de BSA formadas foram purificadas por três ciclos de centrifugação a 13.000 g durante 30 minutos para eliminar o BSA livre e o excesso de agente de reticulação. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos ressuspensos em PBS estéril (concentração final de 20 mg/mL).

As nanopartículas foram analisadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pelo equipamento Inspect F50-FEI (Holanda). O tamanho, a distribuição de tamanho e o potencial zeta das partículas foram medidos por Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano ZS) com base na Técnica de Dispersão Dinâmica de Luz.

4.3 Protocolo de imunização

Os camundongos Swiss com seis a oito semanas de idade foram mantidos com acesso livre à água e alimentos e todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UNIFAL. Os camundongos foram imunizados pela via subcutânea nos dias 0, 7 e 14 usando 100 µL de nanopartículas vazias (NPv) (n=16) ou 100 µL de nanopartículas associadas aos antígenos de *P. aeruginosa* (NPPa) (n=21), ambos a 20 mg/mL. Outros grupos foram imunizados com 100 µL de PBS (n=6) ou com 100 µL de PBS contendo 15 µg de antígenos de *P. aeruginosa* (Pa) (n=6). Sete dias após a última imunização (no dia 21), os camundongos foram sacrificados, o sangue foi coletado por punção cardíaca e os soros foram separados. A imunogenicidade de todas as formulações foi feita através da medição dos níveis de anticorpos específicos para *P. aeruginosa* no soro.

4.4 Ensaio de ELISA para quantificação de anticorpos IgG anti-BSA

A fim de descobrir se as nanopartículas de BSA são capazes de elicitar, por si só, a resposta imunológica de camundongos Swiss, foram realizados ensaios de ELISA para quantificar anticorpos IgG total anti-BSA. Para tal, os orifícios de placas de microtitulação de 96 poços foram revestidos com BSA (2 µg/poço) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e a placa incubada durante a noite a 4°C e, em seguida, lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). Subsequentemente, as placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBST) durante 2 horas a 37°C. Após três lavagens, o soro dos animais imunizados foi diluído seriadamente (1/10 a 1/1280) em PBST e adicionado aos poços correspondentes, sendo as placas incubadas durante 1 hora a 37°C. Após três lavagens, as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C com 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) diluído a 1:5000 em PBST. Após três lavagens, as placas foram incubadas com 0,1 mL de H₂O₂ a 0,045% e 0,4 mg/mL de orto-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M, 0,2 M de fosfato de sódio dibásico a pH 5,0) durante 15 minutos à 25°C, protegidas da luz. A reação foi parada pela adição de 50 µL de 2 M de H₂SO₄. As densidades ópticas foram lidas a 450 nm com um leitor de microplacas.

O ponto de corte foi determinado pela leitura da absorbância média do controle negativo mais duas vezes o desvio padrão. O título registrado foi considerado sendo a maior diluição de cada amostra de soro que mostrou reatividade acima do ponto de corte.

4.5 Ensaio de ELISA para quantificação de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*

A quantificação dos anticorpos IgG total e subtipos IgG1 e IgG2a anti-*P. aeruginosa* dos animais imunizados foi realizada usando placas de microtitulação de 96 poços. Os orifícios foram revestidos com os antígenos totais extraídas de *P. aeruginosa* (2 µg/poço) diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e a

placa incubada durante a noite a 4°C. O protocolo foi seguido como descrito anteriormente no item 5.4. Anticorpos anti-IgG1 (1:2000) ou IgG2a (1:3000) de camundongo conjugado com peroxidase também foram usados para determinação do título dos subtipos de IgG do soro coletado.

4.6 Estudos em animais

Duas semanas após a última imunização, os camundongos foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (60 mg/Kg de Ketamina e 8 mg/kg de Xilazina) e desafiados com $1,5 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia (UFC) de *P. aeruginosa* ATCC 27853 diluídos em 10 µL de PBS pela via nasal em cada narina. Um e quatro dias pós-infecção, os camundongos foram sacrificados e os pulmões foram coletados para estudos histopatológicos, para a determinação do número de unidades formadoras de colônia por miligrama de tecido e para quantificação da carga microbiana por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real.

4.7 Histopatologia

Os pulmões direitos dos camundongos foram fixados com formaldeído a 10% em PBS a temperatura ambiente, desidratados em etanol e incluídos em parafina. Secções seriais (5 µm) foram coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas dos tecidos foram examinadas sob microscópio óptico e foram capturadas as imagens com o microscópio câmera Canon G10 Power Shot digital, sendo estas imagens analisadas com o software Remote Capture DC version 4.8.

Os cortes foram avaliados em análises de duplo-cego em uma escala relativa onde zero representa ausência de inflamação, 1 representa inflamação mínima, 2 representa inflamação moderada e 3 representa inflamação severa. Adicionalmente, os eventos de edema, hemorragia e hiperemia também foram avaliados em uma escala relativa onde zero representa ausência destes sintomas, 1 representa

sintomas leves, 2 representa sintomas moderados e 3 representa sintomas severos (WITTKKE et al., 2007).

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

Os pulmões esquerdos dos camundongos foram divididos ao meio. Uma metade foi imediatamente macerada para contagem de bactérias e a outra metade foi congelada a -20°C para posterior extração de DNA e quantificação da carga bacteriana. Resumidamente, o fragmento do pulmão foi previamente pesado e depois macerado em 1 mL de PBS. Após a maceração, realizou-se uma diluição seriada da suspensão (10^0 a 10^5) e 25 μL de cada diluição foram adicionados aos poços de placas de 6 poços contendo ágar Luria Bertani. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Após este período realizou-se a contagem de UFC. O cálculo do número de UFC/mL foi feito multiplicando-se o número de colônias encontradas pelo inverso da diluição e corrigindo-se o volume para determinar o número total de colônias encontradas em 1 mL de PBS. Este número foi dividido então pelo peso do órgão para se encontrar o número total de UFC/mg de tecido.

4.9 Quantificação da carga microbiana por PCR em Tempo Real

Em seguida realizou-se a extração do material genético total dos fragmentos de pulmão congelados, por meio do *Kit WIZARD*[®] de purificação de DNA genômico (Promega, EUA) a partir de órgãos conforme instruções do fabricante. Realizou-se em seguida uma corrida eletroforética com 10 μL do DNA extraído em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5x (Tris Base 0,45 M; Ácido Bórico 0,45 M; 20 mL EDTA 0,5 M pH=8.0) com a finalidade de comprovar a integridade do DNA. Antes da aplicação no gel, o material genômico extraído foi acrescido de 5 μL de GelRed diluído 1% (Biotium) e 5 μL de tampão de aplicação da amostra 10x (azul de bromofenol 0,25%; 150 mM Tris pH=7.6; glicerol 60%). A fim de se visualizar o DNA

genômico usou-se transluminador de luz ultravioleta (UV- 302 nm). Após, realizou-se a quantificação do DNA genômico por espectrofotometria, utilizando o equipamento Nanodrop[®].

Paralelamente, realizou-se a extração do material genético de culturas puras de *P. aeruginosa*, cultivadas em caldo BHI, por meio do *Kit WIZARD*[®] de purificação de DNA genômico conforme protocolo descrito pelo fabricante. Após extraído o DNA, a análise da integridade do material genômico e a quantificação foi realizada conforme descrito anteriormente.

Para quantificação do DNA de *P. aeruginosa* nos fragmentos dos pulmões retirados dos camundongos, usou-se a técnica de PCR em Tempo Real, a partir da amplificação do gene da subunidade A da DNA girase (*gyr A*) (fragmento de 159 pares de base) da *P. aeruginosa*. Para detecção do gene *gyrA* da *P. aeruginosa*, os oligonucleotídeos senso (5'-CAAGCCCTACAAGAAATCCG-3') e anti-senso (5'-TCCACCGAACCGAAGTTG-3') foram usados (SUN; QUIAN; WU, 2011). Cerca de 10 ng de DNA genômico extraído dos órgãos foi utilizado como molde na reação de PCR em Tempo Real. A reação usou o qPCR SYBR-Green (Ludwig Biotecnologia) conforme instruções do fabricante.

A reação foi levada ao aparelho 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems) para amplificação e detecção do material genético. As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, em seguida um estágio de espera de 94°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Seguindo o processo, realizou-se obtenção de dados para análise da curva de dissociação. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e, para a construção da curva padrão de amplificação do gene *gyrA*, o DNA bacteriano obtido foi diluído seriadamente e usado como molde na reação de amplificação (10^0 a 10^{-8}).

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas pelo software GraphPad Prism[®] 4.0. Análises estatísticas do ELISA e resultados histopatológicos foram realizados utilizando a análise multivariada de Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn. O nível mínimo de significância aceita foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, realizou-se a extração dos antígenos totais de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os antígenos obtidos a partir da extração das células estão representados na Figura 3.

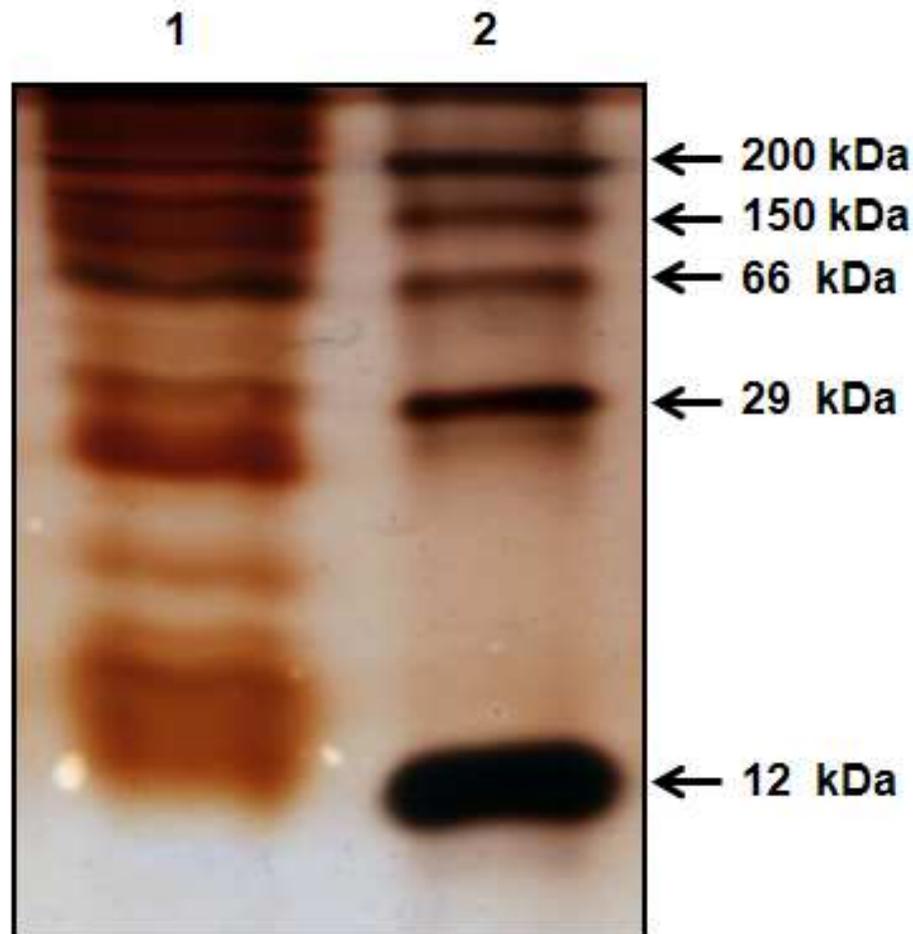


Figura 3 - Análise por SDS-PAGE. A canaleta 1 contém as proteínas extraídas de *P. aeruginosa* cepa ATCC 27853 e a canaleta 2 contém o padrão de peso molecular.

Fonte: Da autora.

Este perfil eletroforético indica que o extrato antigênico contém várias proteínas que podem ser originadas de várias partes da célula bacteriana. Uma vez que a extração de proteínas foi realizada através da lise celular e não purificamos as proteínas extraídas, possivelmente, além de proteínas, o nosso extrato antigênico pode conter outros componentes, como lipídeos e carboidratos. Entre as proteínas que podem estar presentes neste extrato antigênico estão as proteínas da

membrana externa (como exemplo, OprF e OprI), toxinas, pili e flagelos. Esses antígenos de *P. aeruginosa* têm sido investigados como possíveis alvos para o desenvolvimento de vacinas. A vacinação com antígenos da membrana externa tem se mostrado eficaz contra a infecção por *P. aeruginosa* em uma série de estudos. Estes estudos têm utilizado células inteiras inativadas (CRIPPS et al., 2006), preparações da membrana externa purificadas, proteínas de membrana externa isoladas (GILLELAND et al., 1984; GILLELAND; GILLELAND; MATTHEWS-GREER, 1988), fusões de proteínas ou peptídeos sintéticos que representam epítomos protetores (GILLELAND et al., 2000).

Os esforços iniciais para desenvolver uma vacina contra a *P. aeruginosa* focaram principalmente no LPS. Embora a vacinação com LPS de *P. aeruginosa* foi eficaz em vários modelos animais e levou à produção de anticorpos com alta capacidade de opsonização, a eficácia em estudos humanos foi limitada pela diversidade antigênica dos antígenos entre os isolados de *P. aeruginosa* (DIGIANDOMENICO et al., 2007).

Devido à diversidade antigênica do LPS, estudos mais recentes concentraram-se nas proteínas flagelina, OprI e OprF como antígenos potenciais, uma vez que estas exibem sequências conservadas de aminoácidos (FINKE et al., 1990; MANSOURI et al., 2003).

O principal constituinte da proteína porina de *P. aeruginosa*, OprF, demonstrou-se ser antigênico e possui uma elevada homologia entre as estirpes de *Pseudomonas*. Estudos utilizaram o OprF como alvo da vacina e mostraram que o antígeno fornece proteção contra a infecção pela bactéria (GILLELAND et al., 1984; GILLELAND; GILLELAND; MATTHEWS-GREER, 1988; BAUMANN et al., 2007; WORGALL et al., 2007; KRAUSE et al., 2011). Em estudos relacionados, a imunização com o antígeno OprI de *P. aeruginosa* e um adjuvante apropriado eliciou uma resposta protetora em camundongos que se correlacionou com a titulação de IgG contra OprI (FINKE et al., 1990).

Pseudomonas aeruginosa possui dois tipos de flagelinas, tipo A e tipo B, que diferem na composição de aminoácidos e o comprimento da região hipervariável. Flagelinas de *P. aeruginosa* têm a propriedade única de serem adjuvantes potentes, que sinalizam via receptor Toll-like 5, bem como antígenos protetores (CIACCI-WOOLWINE; MCDERMOTT; MIZEL, 1999; BATES et al., 2008; WEIMER et al., 2009). Um ensaio clínico de fase III com flagelinas de *P. aeruginosa* em pacientes

com FC demonstrou que a vacina foi bem tolerada e causou uma redução de 30% na incidência da infecção (DÖRING et al., 2007).

Levando-se em consideração os estudos anteriores, a nossa preparação, utilizando antígenos da célula inteira, pode ser um excelente alvo para vacina, já que possivelmente pode conter vários antígenos imunogênicos (LPS, OprF, OprI e flagelinas).

Nos últimos anos, as partículas de escala nanométrica estão sendo cada vez mais utilizadas como transportadores de antígenos. Estudos indicam que essas nanopartículas têm atividade adjuvante, o que provavelmente é devido à facilidade das APCs em fagocitar os antígenos associados às partículas, em comparação com os antígenos livres em solução (SLOAT et al., 2010). Além disso, nanopartículas têm a capacidade de proteger a integridade dos antígenos encapsulados contra a degradação até serem entregues às células imunes (OYEWUMI et al., 2010).

A albumina é um transportador macromolecular atraente, pois é biodegradável, atóxica, metabolizada *in vivo* e solúvel em água. Essas características facilitam a entrega de substâncias e, assim, é um candidato ideal para a preparação de nanopartículas. Sendo assim, a BSA é amplamente utilizada para entrega de fármacos não só pelas características acima citadas, como também pela sua importância médica, baixo custo, propriedades de ligação à diversas substâncias e sua ampla aceitação na indústria farmacêutica (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012a).

As nanopartículas utilizadas neste estudo foram produzidas pelo método de coacervação. As nanopartículas produzidas foram avaliadas através de MEV e o tamanho, a distribuição de tamanho e o potencial zeta das partículas foram medidos por Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano ZS). A análise da Dispersão Dinâmica de Luz mostrou que NPPa sintetizadas tiveram um diâmetro médio de $512 \pm 14,89$ nm e o potencial zeta médio de $-13,86 \pm 0,6$ mV. Estes valores foram muito similares aos valores das NPv ($459,36 \pm 16,58$ nm e $-13,03 \pm 1$ mV). A Figura 4 mostra as imagens de MEV das nanopartículas de BSA e conforme esperado as nanopartículas apresentaram forma esférica.

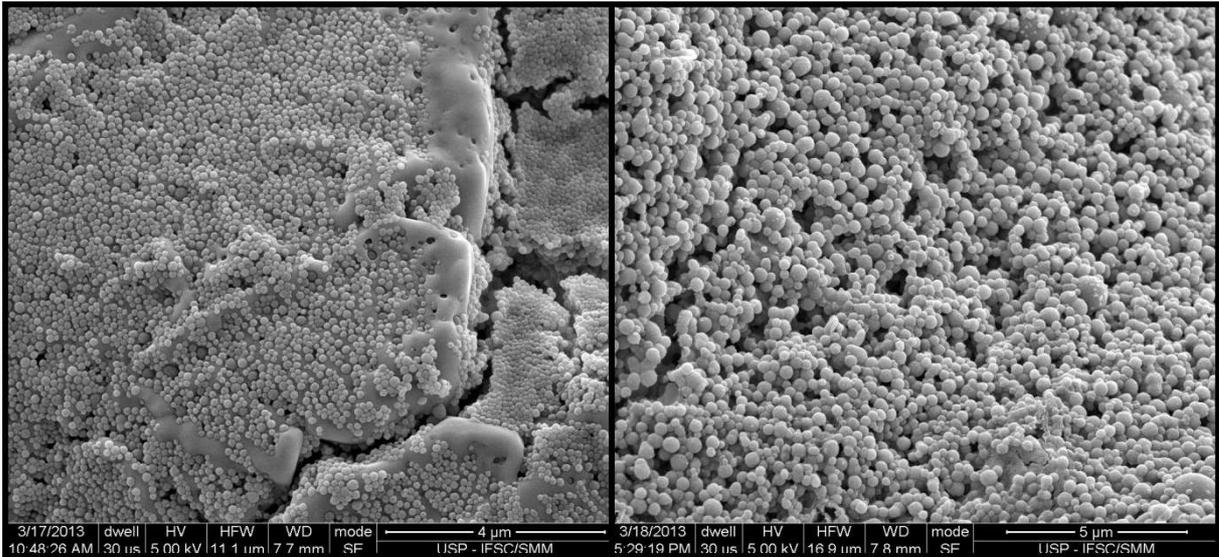


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos de *P. aeruginosa* produzidas. Diâmetro médio= $512 \pm 14,89$ nm; potencial zeta médio= $-13,86 \pm 0,6$ mV.

Fonte: Da autora.

Outros estudos obtiveram nanopartículas de albumina com tamanho que varia entre 100 e 900 nm (LI et al., 2008; ZU et al., 2009; KOUCHAKZADEH et al., 2010; ZHAO et al., 2010; SILVA et al., 2012; YOGASUNDARAM et al., 2012). Essa variação pode ser devida às diferentes formas de preparo e às diferentes substâncias encapsuladas e/ou adsorvidas às nanopartículas.

O potencial zeta reflete o potencial elétrico da superfície das partículas, o qual é influenciado pela composição da partícula e o meio no qual ele está disperso. Os fosfolípidos e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Um valor de potencial zeta relativamente alto ($> \pm 30$ mV) é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (MOHANRAJ; CHEN, 2006; SCHAFFAZICK et al., 2003).

O potencial zeta determina a mobilidade eletroforética das partículas em solução sobre a progressão em direção ao eletrodo de carga oposta, na presença de um campo elétrico. A mobilidade eletroforética pode ser calculada através da análise de eletroforese realizada em diferentes condições experimentais. Alternativamente, pode ser determinada através de um laser Doppler usando dispositivos de dispersão dinâmica da luz. No entanto, a sensibilidade do efeito de Doppler é baixa para a mobilidade de partículas maiores, o que torna difícil o cálculo da mobilidade

eletroforética (FREIRE et al., 2011). O Zetasizer Nano ZS utiliza a técnica de dispersão dinâmica da luz para medir partículas e a técnica de Laser Doppler para medir o potencial zeta (MALVEN INSTRUMENTS LIMITED).

Nossas partículas apresentaram um potencial zeta de aproximadamente -13 mV. Segundo os autores acima citados, para a estabilidade da suspensão coloidal, o valor do potencial deve estar acima de (\pm) 30 mV. Pelas imagens da MEV e análises com microscópio óptico, não observamos agregados de nanopartículas, o que nos mostra a estabilidade destas, apesar de um valor baixo de potencial zeta. Uma vez que as nanopartículas produzidas possuem um tamanho aproximado de 500nm, pode ser que a técnica de Laser Doppler não tenha sido tão eficaz para medir o potencial zeta ou que o valor encontrado para as nanopartículas produzidas (aproximadamente -13 mV) seja o suficiente para gerar estabilidade da suspensão.

Após a produção e caracterização das nanopartículas, camundongos Swiss de 6-8 semanas de idade foram imunizados pela via subcutânea. Os animais foram imunizados 3 vezes, com intervalos de 1 semana como descrito anteriormente (CAMPODÓNICO et al., 2011; WU et al., 2012; KAMEI et al., 2013). Após a imunização não foi observado nenhum efeito adverso nos animais e nenhuma alteração de comportamento.

A administração subcutânea é a via mais adequada para a entrega de um antígeno, pois este pode drenar diretamente do local da injeção para os linfonodos, onde as células imunocompetentes residem e onde a imunidade adaptativa é iniciada (OUSSOREN; STORM, 2001).

As nanopartículas, que possuem um tamanho que varia entre 1-1000 nm, são consideradas adjuvantes promissores para a imunização subcutânea (PITAKSUTTEEPONG, 2005). O destino das partículas após a administração subcutânea é dependente do tamanho (HIGUCHI et al, 1999). Partículas grandes (maiores que 1000nm) são incapazes de acessar os vasos linfáticos e não podem ser fagocitadas prontamente. Assim, elas são retidas no local da injeção até que são degradadas a um tamanho suficientemente pequeno. Inversamente, as partículas pequenas (inferiores a 1000 nm) conseguem penetrar capilares linfáticos. Demonstrou-se que as partículas com tamanho de 20-200 nm podem acessar os nódulos linfáticos, através de capilares e vasos, para apresentação de antígenos; enquanto que as partículas maiores (500-1000 nm) são geralmente dependentes de transporte até os linfonodos. Estas são favoravelmente fagocitadas pelas APCs, tais

como DCs, que, posteriormente, fazem a passagem para os capilares linfáticos (PITAKSUTTEEPONG, 2005; OYEWUMI et al., 2010).

Diante disso, podemos presumir que, uma vez que as nanopartículas produzidas possuem o tamanho médio de $512 \pm 14,89$ nm, essas partículas poderiam ser fagocitadas por DCs e/ou encaminhadas através de capilares e vasos linfáticos até os linfonodos, após a imunização subcutânea. Assim, nos linfonodos, as DCs poderiam apresentar os antígenos aos linfócitos, iniciando uma resposta imune adaptativa.

Além do tamanho da partícula, outra característica que influencia a absorção pode ser a forma desta partícula. A fagocitose de partículas requer a modificação do citoesqueleto que permite que a membrana mova-se sobre estas partículas para interiorizá-las. A complexidade da modificação do citoesqueleto que deve ser criada depende da curvatura no ponto de contato inicial. Sendo assim, partículas esféricas possivelmente são melhor fagocitadas do que partículas cilíndricas ou em forma de bastonete (VAN RIET et al., 2014). Diante disso, a forma esférica das nanopartículas produzidas neste estudo, possivelmente facilita a fagocitose pelas APCs, favorecendo a ativação de uma resposta imune efetiva.

Nanopartículas administradas pela via subcutânea ou intradérmica podem ativar o sistema complemento local, beneficiando a eficácia da vacina. Além do seu papel primário na depuração do agente patogênico, o sistema do complemento também promove as imunidades humoral e mediada por células, através do aumento da resposta da célula B ao antígeno e promoção da ativação das células T e das DCs (DOBROVOLSKAIA et al., 2008). Entretanto, estudos utilizando as NPPa e NPv devem ser realizados para verificar a interação destas com o sistema complemento.

Os camundongos imunizados com PBS, Pa, NPv ou NPPa foram avaliados quanto à produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa* (IgG total, IgG1 e IgG2a), a fim de se verificar a imunogenicidade destas formulações. Para isto, foi realizada a medida dos níveis de anticorpos específicos contra *P. aeruginosa* no soro dos camundongos previamente imunizados com 2 mg de NPPa por dose/animal (n=21). Como grupo controle, camundongos foram inoculados com NPv (n=16). Camundongos adicionais foram imunizados com PBS (controle negativo) (n=6) ou 15 µg de antígenos totais extraídos da bactéria (Pa) (controle positivo) (n=6).

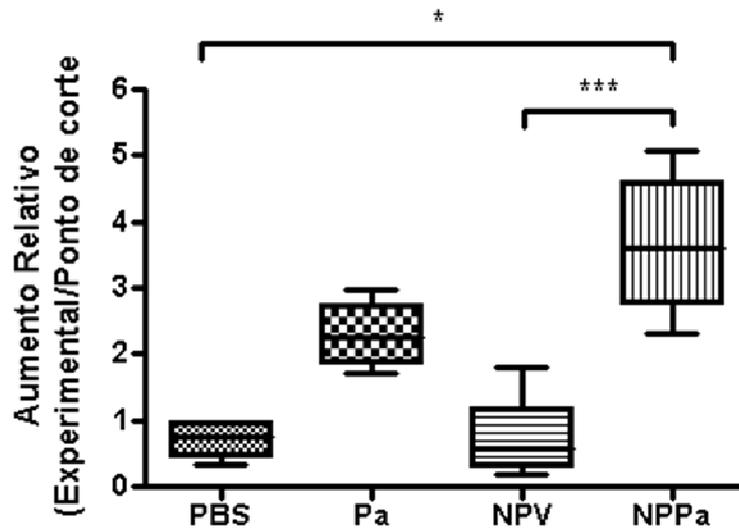
O soro dos camundongos imunizados com NPPa tiveram uma produção elevada de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* se comparado ao grupo NPv ($p < 0,0001$) e uma produção significativa de anticorpos se comparado ao grupo tratado com PBS ($p < 0,05$) (Figura 5A). Entretanto, camundongos imunizados somente com Pa mostraram uma elevada, mas não significativa, produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa* se comparado ao grupo PBS. Também não há diferença significativa na produção de anticorpos entre os grupos Pa e NPPa. A elevada produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* do grupo NPPa, quando comparada ao grupo NPv, indica que a conjugação dos antígenos totais extraídos da bactéria às nanopartículas de BSA foi eficiente.

Para caracterizar a produção dos subtipos de IgG nos camundongos imunizados, foram realizados ensaios de ELISA para quantificar anticorpos IgG1 e IgG2a contra antígenos totais extraídos de *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram altos títulos de IgG1 nos grupos Pa e NPPa, mas em contraste, somente camundongos imunizados com NPPa produziram títulos significativos de IgG2a anti-*P. aeruginosa* (Figura 5B).

IgG2a é um isotipo de IgG que, em camundongos, é capaz de induzir a fagocitose dependente de anticorpos e também de ativar o complemento (LAI et al., 2005; DUNKLEY et al., 2003). A presença de IgG2a anti-*P. aeruginosa* e a redução dos sinais inflamatórios após a infecção com *P. aeruginosa* observada em camundongos imunizados com NPPa (ver figura 7), reforça a possibilidade de que estes anticorpos poderiam ser úteis para a eliminação bacteriana melhorada nas vias aéreas destes camundongos. Entretanto, não podemos excluir o papel da imunidade celular, especialmente dos macrófagos alveolares, neutrófilos, células NKT e células Th17 na imunidade protetora mediata contra infecções por *P. aeruginosa* (WORGALL, 2012).

O LPS de *P. aeruginosa* é um fator de destaque tanto na virulência bacteriana quanto na resposta do hospedeiro à infecção. A contribuição do LPS para a patogênese e para a imunidade do hospedeiro varia de acordo com a suscetibilidade do paciente à infecção, a isoforma do LPS, especialmente o componente lipídico A, e a variação estrutural na cadeia lateral do antígeno O. O lipídio A pode ser variavelmente penta, hexa ou hepta-acetilado, e essas isoformas têm diferentes capacidades de ativar a imunidade inata do hospedeiro via ligação ao receptor Toll-like 4 (PIER, 2007).

A



B

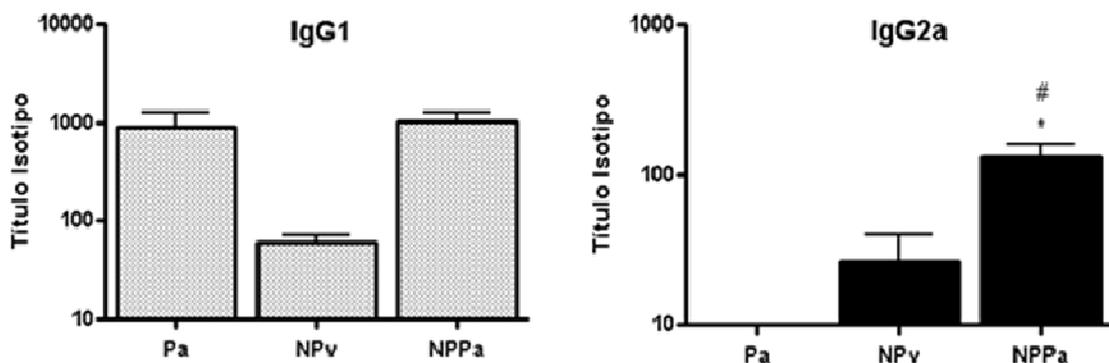


Figura 5 - Produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa* em camundongos imunizados:

A) Camundongos Swiss foram imunizados de acordo com a metodologia indicada e os soros foram coletados uma semana após a última imunização. * indica significância de $P < 0,05$; *** indica significância de $P < 0,001$

B) Titulação das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) em camundongos Swiss imunizados por via subcutânea. Soro de 5 camundongos por grupo foram coletados uma semana após a última imunização, misturados e testados por ELISA para a presença de anticorpos específicos. Os resultados são reportados como valores médios \pm desvio padrão. * Indica significância de $P < 0,05$ (Pa contra NPPa) e # indica significância de $P < 0,05$ (NPv contra NPPa)

Fonte: Da autora.

Os primeiros estudos de vacinação com extratos bacterianos identificaram o componente LPS destas vacinas como o alvo principal para o reconhecimento do sistema imune. No entanto, os efeitos tóxicos associados ao lipídeo A dificultou o seu desenvolvimento clínico. A toxicidade do LPS poderia ser reduzida com a incorporação deste em lipossomas (SHARMA; KRAUSE; WORGALL, 2011). Como uma forma de contornar o problema, polissacarídeos O sem o componente lipídico

têm sido usados em formulações vacinais. Este se mostrou um imunógeno eficaz e não tóxico em camundongos, em porquinhos da índia e em humanos (CRYZ JR et al., 1987).

O LPS não foi dosado no nosso extrato antigênico, mas possivelmente deve estar presente. A toxicidade desse antígeno bacteriano, se presente, pode ter sido contornada pelo encapsulamento nas nanopartículas de BSA, uma vez que não observamos nenhum efeito adverso nos camundongos imunizados. A provável presença de LPS nas nanopartículas de BSA associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa*, pode ter auxiliado a ativação da resposta imune dos animais imunizados, levando à elevada produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa*.

Os camundongos imunizados com PBS, Pa, NPv ou NPPa também foram avaliados quanto à produção de anticorpos IgG total anti-BSA. Os resultados mostram a produção de anticorpos IgG anti-BSA tanto nos animais imunizados com NPv quanto nos animais imunizados com NPPa, sendo que não houve diferenças significativas entre os títulos de anticorpos (Figura 6). Nos animais imunizados com Pa não houve a produção de anticorpos IgG anti-BSA (dados não mostrados).

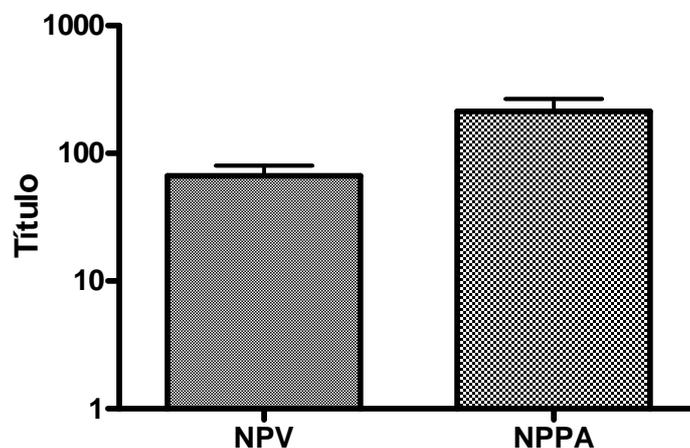


Figura 6 - Produção de anticorpos anti-BSA em camundongos imunizados. Avaliação da produção de anticorpos IgG total anti-BSA em camundongos imunizados com nanopartículas de BSA vazias (NPV) ou nanopartículas de BSA associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa). Não houve diferenças significativas.

Fonte: Da autora.

Os resultados mostram que as nanopartículas de BSA são capazes de eliciar uma resposta imune no modelo murino. Sendo assim, podemos presumir que a BSA

é imunogênica, podendo atuar como adjuvante na imunização. Um adjuvante é definido como a substância normalmente utilizada com um antígeno para aumentar as suas propriedades imunogênicas através da ativação da resposta imune inata e adaptativa (SHAKYA; NANDAKUMAR, 2012).

Estudos recentes têm demonstrado que a entrega de antígenos por nanopartículas pode melhorar significativamente a imunogenicidade de vacinas devido à intrínseca propriedade imunoestimulatória dos materiais de que são produzidas (SAHDEV; OCHYL; MOON, 2014). Nanopartículas pertencem à categoria de adjuvantes que facilitam a captação do antígeno pelas APCs ou aumentam o influxo de APCs profissionais no local da injeção (REBOUÇAS et al., 2012). Partículas preparadas com materiais biocompatíveis, como a albumina, possuem um grande potencial como sistema de entrega vacinal com uma potente atividade adjuvante (OYEWUMI et al., 2010). A biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil produção e purificação, e a não-toxicidade da maioria dos polímeros, tais como a albumina, os tornam candidatos atrativos para substituir os adjuvantes convencionais, que têm efeitos indesejáveis no hospedeiro (SHAKYA; NANDAKUMAR, 2012).

Como discutido anteriormente, a albumina é capaz de induzir uma resposta imune nos animais imunizados, podendo atuar como adjuvante. A presença de anticorpos anti-*P. aeruginosa* em animais imunizados com NPv pode ser explicada pela ação adjuvante destas nanopartículas, que poderiam ter induzido uma ativação policlonal inespecífica da resposta imune, levando à produção de anticorpos que poderiam exibir reação cruzada contra alguma proteína extraída de *P. aeruginosa*.

Para avaliar a imunidade protetora anti-*P. aeruginosa*, camundongos que tinham sido imunizados com PBS, Pa, NPv ou NPPa foram desafiados com *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($1,5 \times 10^5$ UFC) via nasal em cada narina. Um e quatro dias pós-infecção os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para as análises posteriores. O pulmão direito foi fixado para análises histopatológicas e o pulmão esquerdo foi utilizado para determinação do número de UFC no tecido e para quantificar a carga bacteriana por PCR em Tempo Real.

Após o plaqueamento das diluições seriadas dos fragmentos de pulmão macerados e a incubação por 24 horas a 37°C, não foi observado nenhum crescimento bacteriano. Uma vez que não foi possível contar as UFC nos pulmões

dos camundongos imunizados e desafiados com a bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853, realizou-se a quantificação da carga bacteriana por PCR em Tempo Real.

A extração do DNA total dos fragmentos de pulmão esquerdo congelados dos animais imunizados e desafiados foi eficiente, sendo extraído o material genético íntegro, sem produtos de degradação (dado não mostrado). A quantificação do material genético utilizando Nanodrop[®] revelou concentrações entre 0,9045 e 3,1793 µg/µL, sendo este considerado de boa qualidade. A qualidade deste material é expressa pela razão de absorbâncias entre dois comprimentos de onda (260 e 280nm), sendo considerados puros, para DNA, valores próximos de 1,8. Valores inferiores podem indicar uma má purificação do material, devido à presença de proteínas, fenóis e outros contaminantes (THERMO, 2014).

A partir da diluição do DNA bacteriano extraído de culturas puras de *P. aeruginosa* foi possível obter uma relação entre concentração de produto amplificado com a quantidade de DNA adicionado à reação, gerando assim uma curva padrão que pode ser utilizada para quantificação relativa do gene *gyrA* de *P. aeruginosa*. Após comprovada a integridade e qualidade do material obtido, tentou-se quantificar o gene *gyrA* da *P. aeruginosa* em relação ao material genético total extraído, utilizando 10 ng de DNA em reações de PCR em tempo real. O DNA bacteriano não foi detectado em nenhum dos tempos analisados (dados não mostrados).

O fato da bactéria não ter sido detectada e nem o seu DNA pode indicar fagocitose, degradação e/ou eliminação da bactéria antes mesmo dos tempos analisados (1 e 4 dias pós-infecção). A bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresenta baixa virulência ou capacidade invasiva se comparada a cepas mais virulentas, isoladas de pacientes. A falta de fatores de virulência pode ter interferido na capacidade desta bactéria em estabelecer uma infecção produtiva no animal infectado. Tal suposição pode ser suportada pelo fato de os camundongos não terem ido a óbito, apresentado quaisquer alterações comportamentais após a infecção como também a não detecção da bactéria ou de seu material genômico nos pulmões dos animais infectados.

A avaliação histológica dos cortes dos pulmões dos animais tratados com PBS ou imunizados com Pa ou NPv em todos os tempos testados revelaram grandes áreas de inflamação intensa com um infiltrado inflamatório principalmente mononuclear (Figura 7), indicando que, apesar da bactéria ser eliminada

rapidamente pelo sistema de defesa existente no pulmão dos animais, a presença da mesma induziu sinais inflamatórios mais graves se comparado com o grupo imunizado com NPPa. Também foi verificada nesses três grupos (PBS, Pa, NPv) a presença de vasos hiperêmicos e dilatados, mas com leve edema e hemorragia. Os cortes pulmonares dos animais imunizados com NPPa mostraram uma evidência microscópica menos extensa de danos no tecido. Havia menos vasos hiperêmicos e dilatados, menos hemorragia intra-alveolar, menos edema da parede do septo alveolar, e uma reação inflamatória baixa observada no tecido pulmonar destes animais (Figura 8).

Convém ressaltar também que se pode observar diferenças no tipo de infiltrado inflamatório presente nos tecidos dos animais sacrificados em 1 dia pós-infecção, notando-se a presença de leucócitos polimorfonucleares nos camundongos imunizados com NPv e quase ausência desses, com infiltrado basicamente mononuclear, nos camundongos imunizados com NPPa (dados não mostrados).

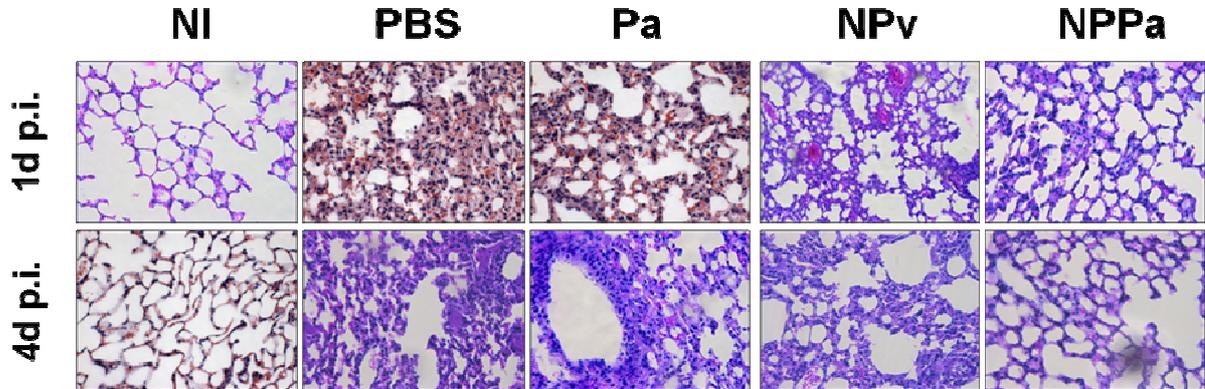


Figura 7 - Alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos imunizados e desafiados com *P. aeruginosa* viva. Coloração por hematoxilina e eosina de cortes de pulmão em 1 e 4 dias após a infecção dos camundongos imunizados com PBS, 15 µg de antígenos totais de *P. aeruginosa* (Pa), nanopartícula de albumina sérica bovina vazia (NPv) e nanopartícula de albumina sérica bovina associada aos antígenos totais de *P. aeruginosa* (NPPa).

Fonte: Da autora.

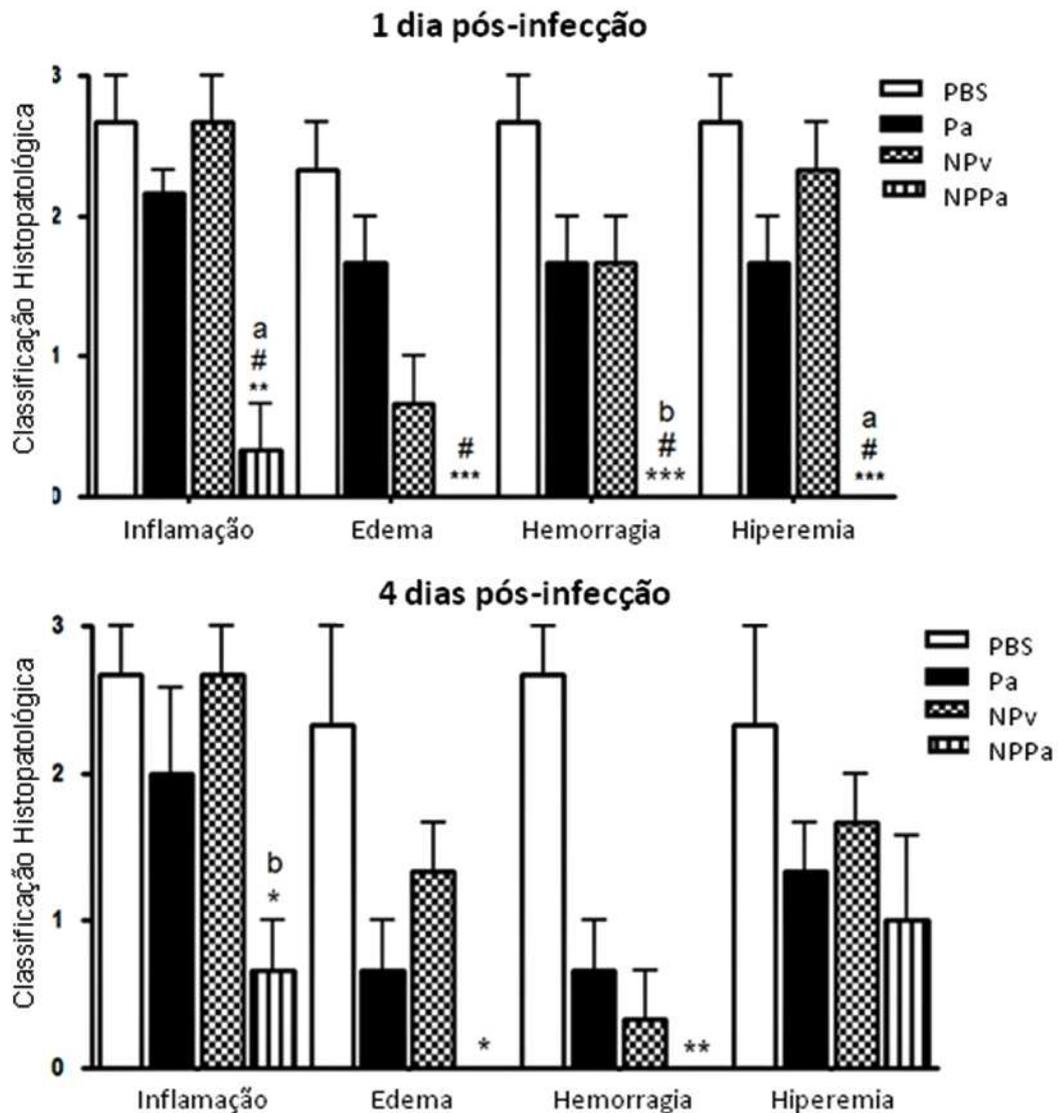


Figura 8 - Análise histopatológica dos pulmões de camundongos imunizados com PBS, Pa, NPv e NPPa, 1 e 4 dias após a infecção. * indica significância de $P < 0,05$ (PBS contra NPPa); ** indica significância de $P < 0,01$ (PBS contra NPPa); *** indica significância de $P < 0,001$ (PBS contra NPPa), # indica significância de $P < 0,05$ (Pa contra NPPa), ^a indica significância de $P < 0,01$ (NPv contra NPPa) e ^b indica significância de $P < 0,05$ (NPv contra NPPa).

Fonte: Da autora.

BNPs são plataformas únicas e inexploradas para melhorar a entrega de antígenos ao sistema imune. BNPs de BSA com proteínas antigênicas adsorvidas ou encapsuladas representam um método promissor para entrega *in vivo* de vacinas diretamente ao sistema imune (SILVA et al., 2012). Os resultados mostram que a imunização com nanopartícula de BSA encapsuladas com antígenos de *P. aeruginosa* foi eficiente em induzir IgG anti-*P. aeruginosa* e também em diminuir sinais inflamatórios desencadeados pela infecção nasal com a bactéria. Esta atividade poderia ser atribuída ao processo de encapsulamento de alguns antígenos

altamente conservados derivados da célula inteira, tais como proteínas da membrana externa e proteínas do flagelo polar (flagelinas tipos a e b) (SPANGENBERG et al., 1996; MONTOR et al., 2009; WEIMER et al., 2009; PELUSO et al., 2010). Como o processo de extração de proteínas é baseado na lise detergente, algumas destas proteínas poderiam ser aprisionadas nas nanopartículas de BSA favorecendo a ativação do sistema imune.

A imunização com nanopartículas contendo antígenos de *P. aeruginosa* foi eficiente em diminuir os sinais inflamatórios, visto na diminuição da intensidade dos processos inflamatórios e na concentração das células inflamatórias no pulmão, tanto em 1 como em 4 dias pós-infecção, também reduzindo as manifestações de edema, hemorragia e hiperemia, na infecção por esta bactéria. Assim como este estudo, outros estudos também mostraram a redução dos sinais inflamatórios em modelos murinos de infecção com *P. aeruginosa* (WEIMER et al., 2009; KERBER-MOMOT et al., 2010; SECHER et al., 2011).

Weimer e colaboradores (2009) demonstraram em seu estudo que a imunização de camundongos com fusão de flagelina contendo OprF e OprI protege os animais contra a patologia pulmonar após desafio por *P. aeruginosa*. Neste estudo, os camundongos imunizados com essa fusão de proteínas (que apresentam sequências de aminoácidos conservadas) apresentaram significativamente menos inflamação em comparação com seu controle que foi imunizado apenas com fusão de OprI e OprF.

Kerber-Momot e colaboradores (2010) também conseguiram resultados positivos na defesa do animal contra a infecção bacteriana. Nesse estudo, uma estimulação única da células Toll-Like (1 dia antes do desafio) com lipopeptídeo ativador de macrófagos de 2 kDA (MALP-2), levou a um aumento da resposta imunológica do hospedeiro, amenizando expressão de sinais inflamatórios e diminuindo a carga bacteriana nos pulmões.

Já Secher e colaboradores (2011) concluíram, em modelo experimental de infecção aguda por *P. aeruginosa*, que um tratamento sistêmico de camundongos com anticorpos monoclonais humanos reforça a eliminação de *P. aeruginosa* e diminui a inflamação nos pulmões.

A inflamação crônica observada em pacientes com FC é devido à persistência da infecção por *P. aeruginosa*. Após a colonização, *P. aeruginosa* inicia a produção elevada de alginato e este, subsequentemente, leva ao desenvolvimento do biofilme

com consequente evasão do sistema imune e aumento da resistência aos antibióticos, fatores que dificultam a erradicação da infecção (RODRIGUEZ-ROJAS et al., 2012). Então, como a NPPa reduz os sinais inflamatórios em camundongos, esta formulação pode ser benéfica aos pacientes com FC e outras condições patológicas envolvendo infecções por *P. aeruginosa* tais como infecções nosocomiais (pacientes paraplégicos, queimados e de unidades de terapia intensiva) e também em pacientes imunossuprimidos com câncer ou AIDS.

6 CONCLUSÕES

Estes resultados nos permitem concluir que:

1. Os antígenos totais de *P. aeruginosa* foram extraídas como o esperado. O perfil eletroforético mostrou a presença de proteínas com pesos moleculares variados;
2. As nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* foram produzidas possuindo diâmetro médio de $512 \pm 14,89$ nm e potencial zeta médio de $-13,86 \pm 0,6$ mV;
3. A conjugação das nanopartículas de albumina sérica bovina com os antígenos totais extraídos de *P. aeruginosa* foi eficiente, demonstrada pela maior produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* nos animais imunizados com as nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* quando comparada à produção de IgG anti-*P. aeruginosa* nos animais imunizados somente com as nanopartículas de albumina sérica bovina vazias;
4. A imunização com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos de *P. aeruginosa* é capaz de induzir a produção de altos títulos de anticorpos IgG1 e títulos significativos de IgG2a anti-*P. aeruginosa*;
5. Esta imunização também é capaz de reduzir sinais de inflamação nos pulmões causados pela infecção nasal com este patógeno, com uma redução significativa na intensidade e concentração de células inflamatórias, diminuição da hemorragia, sinais de edema e hiperemia nos pulmões, tanto em 1 como em 4 dias pós-infecção, se comparado aos outros grupos;
6. Portanto, a imunização com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas aos antígenos totais de *P. aeruginosa* é capaz de induzir uma resposta funcional nos animais modelos de infecção e deste modo é uma promissora plataforma para vacinas contra *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC)®. *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC® 27853™). Disponibiliza informações sobre a linhagem celular ATCC 27853™. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/27853.aspx#history>>. Acesso em: 28 ago. 2014.
- BASARKAR, A.; SINGH, J. Poly (lactide-co-glycolide)-polymethacrylate nanoparticles for intramuscular delivery of plasmid encoding interleukin-10 to prevent autoimmune diabetes in mice. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 72-81, 2009.
- BATES, J. T. et al. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 5, p. 271-281, 2008.
- BAUMANN, U. et al. Assessment of pulmonary antibodies with induced sputum and bronchoalveolar lavage induced by nasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical phase I/II study. **Respiratory Research**, v. 8, n. 57, p. 1-10, 2007.
- BYSTROVA, O. V. et al. Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 46, n.1, p. 85-99, 2006.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, N. 5, p. 631-651, 2002.
- BUONO, C. et al. Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions. **The journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, P. 1373-1381, 2009.
- CAMPODÓNICO, V. L. et al. Efficacy of a conjugate vaccine containing polymannuronic acid and flagellin against experimental *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 8, p. 3455-3464, 2011.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272-283, 2006.

CIACCI-WOOLWINE, F.; MCDERMOTT, P. F.; MIZEL, S. B. Induction of cytokine synthesis by flagella from Gram-negative bacteria may be dependent on the activation or differentiation state of human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5176–5185, 1999.

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

CRYZ JR, S. J. et al. Safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide toxin A conjugate vaccine in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 1, p. 51-56, 1987.

DAAS, H.; ABUHMAID, F.; ZERVOS, M. Successful treatment of *Candida parapsilosis* and *pseudomonas aeruginosa* infection using medical and surgical management in an injecting drug user with mitral and aortic valve endocarditis: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 3, n. 6598, p. 1-3, 2009.

DAI, H. et al. Chitosan-DNA nanoparticles delivered by intrabiliary infusion enhance liver-targeted gene delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 507-522, 2006.

DASGUPTA, T. et al. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 809–817, 1994.

DASGUPTA, N. et al. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 809-824, 2003.

DASGUPTA, S.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Reverse micelle mediated synthesis of calcium phosphate nanocarriers for controlled release of bovine serum albumin (BSA). **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 3112–3121, 2009.

DEAN, C. R.; GOLDBERG, J. B. The wbpM gene in *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O17 resides on a cryptic copy of the serogroup O11 O antigen gene locus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n. 1, p. 59-63, 2000.

DELUCIA, A. M. et al. Lipopolysaccharide (LPS) inner-core phosphates are required for complete LPS synthesis and transport to the outer membrane in *Pseudomonas*

aeruginosa PAO1. **American Society for Microbiology - MBio**, v. 2, n. 4, p.1-9, 2011.

DESAI, N. et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1317-1324, 2006.

DIAZ, M. H. et al. *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 10, p. 4414-4421, 2008.

DIGIANDOMENICO, A. et al. Intranasal immunization with heterologously expressed polysaccharide protects against multiple *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 11, p. 4624-4629, 2007.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

DOGGET, R. G. Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In DOGGET, R. G. (Ed.). ***Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy**. New York: Academic Press Inc, 1979.

DÖRING, G. et al. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 104, n. 26, p. 11020-11025, 2007.

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

EAGLESOME, M. D.; GARCIO, M. M.; BIELANSKI, A. B. A study on the effect of *Pseudomonas aeruginosa* in semen on bovine fertility. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 76-78, 1995.

ELAMANCHILI, P. et al. "Pathogen-mimicking" nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. **Journal of Immunotherapy**, v. 30, n. 4, p. 378-95, 2007.

ELSADEK, B.; KRATZ, F. Impact of albumin on drug delivery—New applications on the horizon. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 1, p. 4–28, 2012.

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, 2012a.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012b.

FAVERO, M. S. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals. **Science**, v. 173, n. 3999, p. 836-838, 1971.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

FINKE, M. et al. Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I expressed in *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 7, p. 2241-2244, 1990.

FINCK-BARBAÇON, V. et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 547-557, 1997.

FREIRE, J. M. et al. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 4, p. 481-487, 2011.

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

GABY, W. L.; HADLEY, C. Practical Laboratory for the Identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 74, n. 3, p. 356-358, 1957.

GALES, A. C. et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997–1998. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. Supplement 2, p. S146–S155, 2001.

GALES, A. C.; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 3, p. 301-311, 2002.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848-854, 2005.

GILLELAND, H. E. et al. Use of a purified outer membrane protein F (Porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. **Infection and Immunity**, v. 44, n. 1, p. 49-54, 1984.

GILLELAND, H.; GILLELAND, L. B.; MATTHEWS-GREER, J. M. Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1017-1022, 1988.

GILLELAND, H. E. et al. Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 291-297, 2000.

GRADISHAR, W. J. et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 31, p. 7794-7803, 2005.

GREGORY, A. E.; TITBALL, R.; WILLIAMSON, D. Vaccine delivery using nanoparticles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 13, p. 1-13, 2013.

GRUNDMANN, H. et al. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.3, p. 528-534, 1995.

GUIMARÃES, T.; CARVALHEIRA, J.; ROCHA, A.. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 1-20, 2012.

HANCOCK, R. E.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 4, p. 247–255, 2000.

HARADA, K. et al. Post-antibiotic effect of orbifloxacin against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 16, p. 1-5, 2012.

HARTL, D. et al. Pulmonary TH2 response in *Pseudomonas aeruginosa* –infected patients with cystic fibrosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 204-211, 2006.

HAUSER, A. R.; KANG, P. J.; ENGEL, J. N. PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 807-818, 1998.

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

HEDAYATI, R.; JAHANSHAH, M.; ATTAR, H. Fabrication and characterization of albumin-acacia nanoparticles based on complex coacervation as potent nanocarrier. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 10, p. 1401–1408, 2012.

HIGUCHI, M. et al. Transport of colloidal particles in lymphatics and vasculature after subcutaneous injection. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, n. 4, p. 1381-1387, 1999.

HIRAKAWA, Y. et al. Prevalence and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in chinchillas. **BMC veterinary research**, v. 6, n. 52, p. 1-10, 2010.

HORZEMPA, J. et al. Immunization with a *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin provides O-antigen-specific protection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 590-597, 2008.

JÁCOME, P. R. L. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 707-712, 2012.

Jl, J. et al. Ultrasound-targeted transfection of tissue-type plasminogen activator gene carried by albumin nanoparticles to dog myocardium to prevent thrombosis after heart mechanical valve replacement. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p. 2911–2919, 2012.

KAMEI, A. et al. Mucosal vaccination with a multivalent, live-attenuated vaccine induces multifactorial immunity against *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1289-1299, 2011.

KAMEI, A. et al. Collaboration between macrophages and vaccine-induced CD4+ T cells confers protection against lethal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during neutropenia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 39-49, 2013.

KERBER-MOMOT, T., et al. Beneficial effects of TLR-2/6 ligation in pulmonary bacterial infection and immunization with *Pseudomonas aeruginosa*. **Inflammation**, v. 33, n. 1, p. 58-64, 2010.

KIFFER, C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

KHAIRNAR, K. et al. Novel bacteriophage therapy for controlling metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* infection in Catfish. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 264, p. 1-9, 2013.

KLIPPSTEIN, R.; POZO, D. Nanotechnology-based manipulation of dendritic cells for enhanced immunotherapy strategies. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 523-9, 2010.

KÖHLER, T. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 21, p. 5990-5996, 2000.

KOLLEF, M. H. et al. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. **Chest**, v. 128, n. 6, p. 3854-3862, 2005.

KOMMAREDDY, S.; AMIJI, M. Poly(ethylene glycol)-modified thiolated gelatin nanoparticles for glutathione-responsive intracellular DNA delivery. **National Institutes of Health Public Access**, v. 3, n. 1, p. 32-42, 2007.

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

KOUCHAKZADEH, H. et al. Optimization of PEGylation conditions for BSA nanoparticles using response surface methodology. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1206-1211, 2010.

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.

KRAUSE, A. et al. Protective anti-*Pseudomonas aeruginosa* humoral and cellular mucosal immunity by AdC7-mediated expression of the *P. aeruginosa* protein OprF. **Vaccine**, v. 29, n. 11, p. 2131-2139, 2011.

LAI, Z. et al. Multi-valent human monoclonal antibody preparation against *Pseudomonas aeruginosa* derived from transgenic mice containing human immunoglobulin loci is protective against fatal *Pseudomonas* sepsis caused by multiple serotypes. **Vaccine**, v.23, n. 25, p. 3264-71, 2005.

LAM, J. S. et al. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. **Frontiers in microbiology**, v. 2, n. 118, p. 1-15, 2011.

LAWRENCE, J. G. Horizontal and vertical gene transfer : The life history of pathogens. **Contributions to Microbiology**, v. 12, p. 255-271, 2005.

LEDBETTER, E. C. et al. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 50, n. 2, p. 729-736, 2009.

LI, F. Q. et al. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for live targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1, p. 274–282, 2008.

LIANG, X. J. et al. Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials. **National Institutes of Health Public Access**, v. 9, n.8, p. 697-709, 2008.

- LIU, P. V. et al. Survey of heat-stable, major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 2, p. 256–264, 1983.
- LLANES, C. et al. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5676–5684, 2011.
- LUTZ, J. K.; LEE, J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 2, p. 554-564, 2011.
- LOUIE, A. et al. Pharmacodynamics of levofloxacin in a murine pneumonia modelo of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Determination of epithelial lining fluid targets. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3325-3330, 2009.
- MAHAJAN-MIKLOS, S.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 981-988, 2000.
- MALIK, A. B. Targeting endothelial cell surface receptors: Novel mechanisms of microvascular endothelial barrier transport. **Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 13-17, 2009.
- MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Disponibiliza informações sobre o equipamento Zetasizer nano ZS. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/>>. Acesso em: 04 jun. 2014.
- MANAFI, A. et al. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. **Bio Med Central Microbiology**, v. 9, n. 23, p. 1-5, 2009.
- MANOLOVA, V. et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 5, p. 1404-1413, 2008.
- MANSOURI, E. et al. Clinical study to assess the immunogenicity and safety of a recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF-OprI vaccine in burn patients. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 37, p. 161-166, 2003.

MARCATO, P.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 1-14, 2008.

MARTÍNEZ, A. et al. Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 6, p. 1467-1476, 2012.

MEHRAVAR, R.; SAGHATOLESLAMI, N. Fabrication and evaluation of human serum albumin (HSA) nanoparticles for drug delivery application. **International Journal of Nanoscience**, v. 8, n. 3, p. 319-322, 2009.

MENDES, C. et al. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 5, p. 236-244, 2000.

MIYAIRI, S. et al. Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone–protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1381-1387, 2006.

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

MONTOR, W. R., et al. Genome-wide study of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 11, p. 4877-86, 2009.

MOOLENAR, R. L. et al. A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmission? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 2, p. 80-85, 2000.

MÜLLER, B. G.; LEUENBERGER, H.; KISSEL, T. Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: An optimized manufacturing technique. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 32-37, 1996.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. Washington: The American Society for Microbiology, 2003. v. 1, p. 719 –725.

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

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) Report, data summary from october 1986 – april 1996, issued may 1996. **American Journal of Infection Control**, v. 24, n. 5, p. 380-388, 1996.

NITTA, S. K.; NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1629-1654, 2013.

OLIVEIRA, A. L. et al. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drugresistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplantation - Nature**, v. 39, n. 12, p. 775-781, 2007.

OLIVER, J. C. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, p. 108- 119, 2005.

OUSSOREN, C.; STORM, G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 1, p. 143-156, 2001.

OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; ZHENGRONG, C. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1095-1107, 2010.

PATIL, Y.; PANYAM, J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. **International journal of pharmaceutics**, v. 367, n. 1, p. 195-203, 2009.

PARK, K. Albumin: A versatile carrier for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 3, 2012.

PELUSO, L., et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprF-pulsed dendritic cell immunization. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1-11, 2010.

PETERMANN, S. R. et al. Elastase deficiency phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* canine otitis externa isolates. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 3, p. 632-636, 2001.

PHILLIPS, R. M. et al. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41326-41332, 2003.

PIER, G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. **International journal of medical microbiology**, v. 297, n. 5, p. 277-295, 2007.

PITAKSUTTEEPONG, T. Nanoparticles: A vaccine adjuvant for subcutaneous administration. **Naresuan University Journal**, v. 15, n. 2, p. 53-62, 2005.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 5. ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. p. 2310-2335.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Veterinary medicine – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 8. ed. Philadelphia: Baillière Tindall, 2000. p.881-884.

RAHIMNEJAD, M. M.; JAHANSHAH, 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.

RAHME, L. G. et al. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8815-8821, 2000.

REBOUÇAS, J. S. et al. Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy. **BioMed Research International**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

REDDY, S.; SWARTZ, M. A.; HUBBELL, J. A. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. **Trends of Immunology**, v. 27, n. 12, p. 573-579, 2006.

REITER, W. D.; PALM, P.; YEATS, S. Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 5, p. 1907-1914, 1989.

RICE-FICHT, A. C., et al. Polymeric particles in vaccine delivery. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 106-12, 2010.

RICHARDS, M. J. et al. Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Pediatric**, v. 103, n. 4, p. 39- 43, 1999.

RODRIGUEZ-ROJAS, A.; OLIVER, A.; BLÁZQUEZ, J. Intrinsic and environmental mutagenesis drive diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections. **The Journal Infectious Diseases**, v. 205, n. 1, p. 121-127, 2012.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.9, p.1138-1143, 2011.

ROY, K. et al. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. **Nature Medicine**, v. 5, n. 4, p. 387-391, 1999.

SADER, Helio 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.

SADERI, H. et al. Detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran, Iran. **LabMedicine**, v. 41, n. 10, p. 222-224, 2010.

SAHDEV, P.; OCHYL, L. J.; MOON, J. J. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. **Pharmaceutical research**, p. 1-20, 2014.

SCARFF, J.; GOLDBERG, J. B. Vaccination against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in immunocompromised mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 2, p. 367-375, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHEFFER, M. C. et al. Intrahospital spread of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p.367-371, 2010.

SCHMIDT, K. D; TÜMMLER, B.; RÖMLING, U. Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic Ffibrosis patients and aquatic habitats. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 85-93, 1996.

SECHER, T., et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 LPS immunoglobulin M monoclonal antibody panobacumab (KBPA101) confers protection in a murine model of acute lung infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1100-9, 2011.

SHAKYA, A. K.; NANDAKUMAR, K. S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 10, n. 79, p. 1-16, 2012.

SHARMA, A.; KRAUSE, A.; WORGALL, S. Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. **Human Vaccines**, v. 7, n. 10, p. 999-1011, 2011.

SHEN, K. et al. Extensive genomic plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* revealed by identification and distribution studies of novel genes among clinical isolates. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5272-5283, 2006.

SHI, Q. et al. Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52200-52209, 2004.

SILVA, M. E. Z. et al. Comparison of bacteriological quality of tap water an bottled mineral water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, p. 504 – 509, 2008.

SILVA, E. F., et al. A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2-5, 2012.

SIQUEIRA, V. L. D. et al. High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 49-56, 2013.

SLOAT, B. R. et al. Strong antibody responses induced by protein antigens conjugated onto the surface of lecithin-based nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 1, p. 93-100, 2010.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER JR, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 8, p. 592-605, 2013.

SPANGENBERG, C., et al. Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Lett**, v. 396, n. 2-3, p. 213-7, 1996.

SPENCER, D. H. et al. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 4, p. 1316-1325, 2003.

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

SUN, F.; QIAN, M.; WU, D. Rapid detection and quantification of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water by Real Time PCR. **Institute of Electrical and Electronics Engineers Xplore – Digital Library**, v 3. p. 1983-1985, 2011.

TAZUMI, A. et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from horses in Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 7, p. 456-459, 2009.

TERTILT, C. et al. Expression of B-cell activating factor enhances protective immunity of a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 7, p. 3044-3055, 2009.

THERMO SCIENTIFIC. T042-Technical Bulletin. NanoDrop Spectrophotometers. **260/280 and 260/230 Ratios**. Disponível em: <<http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2014.

TODAR'S ONLINE TEXTBOOK OF BACTERIOLOGY. [Desenvolvida por Kenneth Todar, Departamento de Bacteriologia, Universidade de Wiscosin-Madison, EUA]. 2012. Disponibiliza informações sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Disponível em: <<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>>. Acesso em: 31 abr. 2014.

VAN RIET, E. et al. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2014.

XU, R.; FISHER, M.; JULIANO, R. L. Targeted albumin-based nanoparticles for delivery of amphipathic drugs. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 870–878, 2011.

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

WEIMER, E. T. et al. A fusion protein vaccine containing OprF epitope 8, OprI, and type A and B flagellins promotes enhanced clearance of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p.2356-2366, 2009.

WIDEMAN, W. L. *Pseudomonas aeruginosa* otitis media and interna in a chinchilla ranch. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 8, p. 799-800, 2006.

WILSON, D. S. et al. Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- α -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. **Nature Materials**, v. 9, p. 923-928, 2010.

WITTKER, A., et al. Vitamin D receptor expression by the lung micro-environment is required for maximal induction of lung inflammation. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 460, n.2, p. 306-13, 2007.

WOLFGANG, M. C. et al. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8484-8489, 2003.

WORGALL, S. et al. Protective immunity to *Pseudomonas aeruginosa* induced with a capsid-modified adenovirus expressing *P. aeruginosa* OprF. **Journal of Virology**, v. 81, n. 24, p. 13801-13808, 2007.

WORGALL S. 40 years on: have we finally got a vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*? **Future Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1333-5, 2012.

WORLITZSCH, D. et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 3, p. 317-325, 2002.

WU, W. et al. Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 5, p. 420, 2012.

YANG, Y. Y. et al. Polymeric core-shell nanoparticles for therapeutics. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 557-562, 2006.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1184-1190, 2006.

YOGASUNDARAM, H. et al. BSA nanoparticles for siRNA delivery: coating effects on nanoparticle properties, plasma protein adsorption, and in vitro siRNA delivery. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, n. 584060, p. 1-10, 2012.

ZAIDI, T. S.; PRIEBE, G. P.; PIER, G. B. A live-attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine elicits outer membrane protein-specific active and passive protection against corneal infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 975-983, 2006.

ZAMAN, M.; GOOD, M. F.; TOTH, I. Nanovaccines and their mode of action. **Methods**, v. 60, n. 3, p. 226-31, 2013.

ZEMANICK, E. T. et al. Measuring and improving respiratory outcomes in cystic fibrosis lung disease: opportunities and challenges to therapy. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2010.

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

ZU, Y. et al. Optimization of the preparation process of vinblastine sulfate (VBLS)-loaded folate conjugated bovine serum albumin (BSA) nanoparticles for tumor-targeted drug delivery using response surface methodology (RSM). **International Journal of Nanomedicine**, v. 2009, n. 4, p. 321-333, 2009.