

## Avaliação de imunização de nanopartículas de albumina sérica bovina pela via nasal, em modelo murino de infecção pulmonar causada por *Pseudomonas aeruginosa*

*Evaluation of bovine serum albumin nanoparticles immunization administered via the nasal route in a murine model of pulmonary infection caused by Pseudomonas aeruginosa*

William Permagnani Gozzi<sup>1</sup>, Ana Luisa Cauvila dos Santos<sup>1</sup>, Raíne Piva Amaral<sup>2</sup>, Carine Ervolino de Oliveira<sup>3</sup>, Luiz Cosme Cotta Malaquias<sup>4</sup>, Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>5\*</sup>.

<sup>1</sup>Mestre em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL(MG)); <sup>2</sup>Doutoranda, Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). <sup>3</sup>Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas com Ênfase em Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP), Professora Adjunta UNIFAL (MG); <sup>4</sup>Doutor em Bioquímica e Imunologia, UFMG, Professor Titular UNIFAL (MG); <sup>5</sup>Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), UFMG, Professor Titular UNIFAL (MG)

### Resumo

**Introdução:** *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais bactérias associadas a infecções nosocomiais e à resistência aos antimicrobianos. Diante disso, novas abordagens, além do uso de antibióticos, vêm sendo desenvolvidas para o combate a esse patógeno. A nanotecnologia tem se expandido substancialmente nos últimos anos em termos de pesquisa e aplicações. As nanopartículas podem ser utilizadas como sistemas de liberação de fármacos e para aumentar a imunogenicidade e a estabilidade de determinados antígenos. Nanopartículas de albumina sérica bovina que contêm o Poli (I:C) (NPPI) apresentam atividade adjuvante e são candidatas à utilização na composição de várias vacinas. **Objetivo:** avaliar se nanopartículas de albumina sérica bovina com ácido polininosínico policitidílico, associadas a proteínas totais de *P. aeruginosa*, são capazes de proteger camundongos imunizados por via intranasal. **Metodologia:** As NPs foram sintetizadas pelo método de coacervação e analisadas quanto a tamanho, morfologia, potencial zeta e índice de polidispersão. Camundongos C57BL/6 foram imunizados pela via intranasal com as proteínas totais de *P. aeruginosa*, na presença das NPPI, em protocolo de dose-reforço. Os animais imunizados foram desafiados com a cepa virulenta *P. aeruginosa* PA14 e foram encaminhados para determinação da perda de peso, taxa de mortalidade e alterações pulmonares. **Resultados:** as NPPI apresentaram morfologia, índice de polidispersão e potencial zeta semelhantes às nanopartículas vazias produzidas apenas com albumina (NPV). As imunizações não induziram perda de peso nos animais e estimularam a produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* séricos. Os animais imunizados com a formulação vacinal (NPPI e antígenos totais de *P. aeruginosa*) apresentaram perda de peso, taxa de mortalidade e carga bacteriana semelhantes às dos grupos de controle após a infecção *P. aeruginosa*. **Conclusão:** a via de imunização intranasal com a formulação vacinal não promoveu efeito protetivo contra a infecção por *P. aeruginosa*, sendo necessários estudos que possam melhorar a imunogenicidade desse adjuvante pela via intranasal. **Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*; nanotecnologia; albumina sérica bovina; imunoadjuvantes.

### Abstract

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is among the primary bacteria associated with nosocomial infections and antimicrobial resistance. Considering this, new approaches beyond the use of antibiotics are being developed to combat this pathogen. Nanotechnology has expanded substantially in recent years in terms of research and applications. Nanoparticles can be used as drug delivery systems and to improve the immunogenicity and stability of specific antigens. Bovine serum albumin nanoparticles loaded with Poly (I:C) (NPPI) exhibit adjuvant properties and are promising candidates for inclusion in the formulation of various vaccines. **Objective:** to evaluate whether bovine serum albumin nanoparticles containing polyinosinic polycytidylic acid, associated with total proteins of *P. aeruginosa*, are capable of protecting mice immunized via the intranasal route. **Methodology:** the nanoparticles (NPs) were synthesized by the coacervation method and analyzed for size, morphology, zeta potential, and polydispersity index. C57BL/6 mice were immunized intranasally with total *P. aeruginosa* proteins in the presence of NPPI using a prime-boost protocol. Immunized animals were challenged with the virulent *P. aeruginosa* PA14 strain, and weight loss, mortality rate, and lung alterations were assessed. **Results:** The NPPI exhibited morphology, polydispersity index, and zeta potential similar to empty nanoparticles produced only albumin (NPV). The immunizations did not induce weight loss in the animals and stimulated the production of serum anti-*P. aeruginosa* IgG antibodies. Animals immunized with the vaccine formulation (NPPI and total *P. aeruginosa* antigens) showed weight loss, mortality rate, and bacterial load similar to the control groups after *P. aeruginosa* infection. **Conclusion:** Intranasal immunization route with the vaccine formulation did not provide protective effect against *P. aeruginosa* infection, indicating the need for studies to improve the immunogenicity of this adjuvant via the intranasal route.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*. Nanotechnology. Bovine serum albumin. Immunoadjuvant.

**Correspondente, correspondingly:** \*Luiz Felipe Leomil Coelho – Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas, Campus Sede (UNIFAL-MG). Rua Gabriel Monteiro da Silva, nº700, Centro. CEP: 37.130-001. Alfenas (MG). – E-mail: luiz.coelho@unifal-mg.edu.br

## INTRODUÇÃO

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria pertencente à família *Pseudomonadaceae*, gram-negativa ubíqua, podendo ser isolada de diversas amostras ambientais (exemplos: solo e água) e de pacientes hospitalizados, além de superfícies inertes, como cateteres e equipamentos médicos<sup>1,2</sup>. Esse microrganismo é amplamente reconhecido por se tratar de uma bactéria oportunista, capaz de causar infecções hospitalares em seres humanos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e (ou) portadores de doenças crônicas como a fibrose cística (FC)<sup>1-4</sup>. Essa espécie possui grande relevância clínica, devido à possibilidade de expressar fatores de virulência, tais como a produção de toxinas, sistemas de secreção de toxinas e produção de pigmentos como a piocianina e a pioverdina. Além disso, as células bacterianas podem trocar material genético, principalmente através de plasmídeos, que codificam genes responsáveis por gerar fenótipos de resistência aos antibióticos. Essa bactéria também possui uma ampla capacidade de produzir biofilmes, aumentando ainda mais sua capacidade de resistência aos inúmeros fatores de estresse celular, como, por exemplo, os antibióticos<sup>1-5</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), há necessidade urgente de desenvolver novas tecnologias e tratamentos contra patógenos de importância mundial, tal como a *P. aeruginosa*. Em 2017, a bactéria foi classificada como de prioridade crítica na lista de patógenos prioritários da OMS. Porém em 2024, a *P. aeruginosa* foi reclassificada para a categoria de prioridade alta<sup>6,7</sup>. Apesar da reclassificação, o patógeno permanece com altos índices de morbidade e mortalidade, podendo causar infecções em múltiplos órgãos, tais como em rins, bexiga, pele e pulmões, sendo essas últimas as mais graves e recorrentes<sup>3-5</sup>.

Entre as diferentes estratégias que vêm sendo adotadas no tratamento de *P. aeruginosa*, destaca-se o desenvolvimento de vacinas. O objetivo dessa abordagem é sensibilizar o sistema imunológico para que reconheça e elimine eficazmente o patógeno. Esse procedimento exige a seleção de antígenos e epítopos da bactéria, como, por exemplo, o LPS e outras proteínas de membrana<sup>3,5,8</sup>. Atualmente, não há vacinas licenciadas contra *P. aeruginosa*, principalmente devido a sua elevada plasticidade genômica, o que permite o surgimento de cepas resistentes. No entanto, estudos recentes têm apontado formulações promissoras, com potencial para avançar em fases clínicas<sup>5,8</sup>.

As nanopartículas (NPs) são tecnologias promissoras, pois podem atuar como um sistema de entrega ou podem ser associadas com as formulações vacinais, a fim de favorecer o reconhecimento de um epítipo-alvo pelas células do sistema imune e, dessa forma, otimizar a produção de uma resposta imune robusta ao patógeno<sup>5,9,10</sup>. Nesse contexto, nanopartículas de

albumina sérica bovina (BSA) com antígenos totais de *P. aeruginosa* têm demonstrado potencial vacinal em modelos pré-clínicos. Rodrigues et al.<sup>11</sup> (2013) e Moraes et al.<sup>12</sup> (2018) relataram um aumento de anticorpos IgG protetivos contra o patógeno a partir da associação de proteínas de *P. aeruginosa* em formulações de NPs de BSA. Adicionalmente, foi descrito um novo adjuvante nanoparticulado, formado por NPs de BSA, que contém, em sua matriz, o ácido poliinosínico-policidílico (poli I:C), um adjuvante análogo de RNA viral. Essas NPs, ao serem adicionadas a uma formulação vacinal composta pelo domínio III da proteína do envelope do *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), foram capazes de induzir uma resposta de anticorpos neutralizantes. Através de transferência passiva desses anticorpos para camundongos C57Bl/6 neonatos, infectados pelo ZIKV, foi possível demonstrar que esses anticorpos fornecem proteção, mitigando a perda de peso e sinais clínicos ou neurológicos induzidos pela infecção, bem como aumentam significativamente a taxa de sobrevivência dos animais infectados<sup>13</sup>.

Até o momento, há evidências da aplicabilidade no uso de NPs de BSA e de Poli I:C na elaboração de sistemas vacinais, mas não há relatos, na literatura, a respeito do uso de nanopartículas de BSA carregadas com Poli I:C em plataformas vacinais para *P. aeruginosa*. Diante disso, este estudo se propõe a avaliar a aplicação desse novo adjuvante nanoparticulado em uma formulação vacinal com proteínas totais de *P. aeruginosa*, administrada pela via intranasal, em modelo pré-clínico de infecção.

## METODOLOGIA

### Síntese e caracterização das NPs

As NPs compostas apenas de BSA (NPV) foram sintetizadas, seguindo-se o método de coacervação<sup>14</sup>. Elas foram sintetizadas a partir de uma solução de 2% (massa/volume) de BSA dissolvido em água destilada. A solução foi filtrada por filtro de 0,22 µm, e 2 ml dela foi levada para agitação magnética em temperatura ambiente, por um período de 30 minutos. Na etapa de solvatação, foi adicionado um volume de 2 mL de álcool etílico absoluto, gota a gota, até ocorrer a formação de uma suspensão opalescente. Em sequência, foi adicionado, ao sistema, 25 µL de glutaraldeído a 25%, e a solução ficou sob agitação magnética por mais duas horas. Para o processo de purificação, centrifugou-se a solução com as nanopartículas por 15 minutos a 8600 g, a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos com as NPs foram ressuspendidos em PBS, a uma concentração de 10 mg/mL. Para a síntese das nanopartículas de BSA com o poli I:C (NPPI) em sua composição, seguiu-se o mesmo protocolo, com o diferencial de que, na etapa inicial, junto à solução de BSA foram adicionados 200 µL de solução aquosa estéril com poli I:C (Sigma Aldrich), na concentração de 5 mg/mL. A caracterização da

morfologia das NPs foi realizada a partir de microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM – 6360LV) pelo centro de microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O tamanho, a carga e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por meio da técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), utilizando-se o equipamento Zetasizer (Malvern Zetasizer Nano SZ, Reino Unido).

#### Obtenção das proteínas totais de *P. aeruginosa*

Para o crescimento bacteriano da *P. aeruginosa*, isolado PA14, 1mL da cultura congelada a -80 °C do microrganismo foi inoculado em 50 mL de caldo Luria Bertani, e a cultura ficou em agitação a 180 rotações por minuto, por 48 horas, a 37°C. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 3000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspenso em tampão de lise (Guanidina 6 M pH 8,0; 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, PMSF) e deixado em agitação magnética por 1 hora, à temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9800 g e o sobrenadante coletado para a etapa de diálise e concentração em solução salina tamponada (PBS), utilizando-se coluna de diálise Amicon® Ultra-15 (Milipore), conforme recomendação do fabricante. A quantidade de proteínas totais de *P. aeruginosa* (PTPa) foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA)<sup>15</sup>.

#### Ensaio de imunização animal

Camundongos C57BL – 6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade – foram mantidos com acesso livre a água e ração, em condições ambientais controladas. A imunização foi realizada por via intranasal, em três doses (dias 0, 14 e 30), sendo que cada dose consistia em 10 µL da formulação vacinal. Ao total foram estabelecidos sete grupos experimentais cujas formulações vacinais estão descritas a seguir. O grupo NPPI+Pa (n=5) foi constituído por animais imunizados com 100 µg de NPPI e 50 µg de PTPa. No grupo NPPI (n=5), os animais foram imunizados apenas com 100 µg de NPs vazias. O NPV+Pa (n=3) foi constituído de animais imunizados com 100 µg de NPs vazias e 50 µg de PTPa. Animais imunizados com 100 µg de NPV formaram o grupo NPV (n=4). Como controle positivo, animais foram imunizados com 50 µg de PTPa (grupo PBS+Pa = n=5), e como controle negativo, alguns animais foram imunizados apenas com solução salina tamponada estéril (grupo PBS - n=6). Animais não imunizados e não infectados constituíram o grupo NT/NI (n = 3). Os animais foram pesados semanalmente até o fim do processo de imunização. Duas semanas após a última dose de imunização dos animais, o sangue foi coletado a partir da veia submandibular, e o soro foi separado para a avaliação de produção de anticorpos anti-*P. aeruginosa*. Todos os procedimentos envolvendo os animais só foram realizados mediante a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (protocolo Nº: 0034/2021).

#### Desafio dos animais com a cepa PA14 de *P. aeruginosa*

Duas semanas após a imunização, os animais foram anestesiados, conforme foi descrito anteriormente<sup>16</sup>, e desafiados com 10 µL por narina de *P. aeruginosa* ( $4 \times 10^9$  UFC/mL)<sup>17,18</sup>. A avaliação clínica incluiu mortalidade, sinais clínicos e variação de peso por até 48 horas após a infecção. Os animais sobreviventes foram eutanasiados com dose letal de anestésico (300 mg/kg cetamina + 30 mg/kg xilazina)<sup>16</sup>. Os pulmões direitos dos animais foram coletados e macerados em 500 µL de PBS para quantificação de unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC/g). Os pulmões esquerdos foram fixados em formaldeído 10% em solução salina (NaCl 0,9%), para posterior análise histopatológica por hematoxilina e eosina.

#### Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos anti proteínas totais de *P. aeruginosa*

A detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA foi realizada por ELISA. Placas de 96 poços (Nunc®) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de solução com 20 µg/mL de proteínas totais de *P. aeruginosa* em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M, pH 9,6), e incubadas por 16 a 24 horas a 4 °C. Após lavagem com PBS-T (PBS + 0,05% Tween 20), os poços foram bloqueados com leite desnatado em PBS-T e incubados por 2 horas, a 37 °C. Em sequência, a placa foi lavada três vezes com PBS-T para completa remoção do resíduo de bloqueio, e então foram adicionados 100 µL por poço dos soros dos animais diluídos na proporção de 1:50. A placa foi incubada por mais 1 hora, a 37 °C, e lavada com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 µL por poço de anticorpos anti-IgG de camundongos, conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em PBS-T, em uma concentração de 1:5000, e, então, incubou-se a placa por mais 1 hora, a 37 °C. A placa foi lavada em seguida, e, então, foram adicionados 100 µL por poço de uma solução de Tetrametilbenzidina, TMB (Sigma-Aldrich, EUA), em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico [0,1M] e fosfato de sódio [0,1M], pH 4,5) com 0,08% de peróxido de hidrogênio. A reação foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com a adição de 30 µL por poço de ácido sulfúrico 2M, e a placa foi levada para leitura da densidade óptica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa Anthos Zenyth 200rt) em comprimento de onda de 450 nm. O ponto de corte foi definido pela média das absorbâncias do grupo de controle (PBS), somada a duas vezes o desvio padrão. O protocolo foi repetido para quantificação de anticorpos anti-IgM e anti-IgA, mantendo-se as mesmas condições e adequando-se com os respectivos anticorpos secundários (anti-IgM e anti-IgA) na concentração de 1:5000.

### Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) em tecido pulmonar de animais desafiados com *P. aeruginosa*

Os pulmões direitos macerados foram diluídos em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em PBS. Alíquotas de 50  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueadas em ágar LB (placas de 6 poços) e incubadas a 37 °C por 24 horas. A contagem de colônias foi expressa como UFC/mg de tecido.

### Quantificação de anticorpos em tecido pulmonar de animais infectados com *P. aeruginosa*

As amostras de pulmões direitos foram descongeladas e centrifugadas a 1100g por 5 minutos, e, então, os sobrenadantes foram diluídos 1:10 em PBS-T para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA por ELISA, conforme metodologia estabelecida para quantificação de anticorpos no soro.

### Análise histopatológica

Os pulmões esquerdos foram fixados em formaldeído 10% em PBS, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes sagitais de 5  $\mu$ m em micrótomo rotativo, corados por hematoxilina e eosina (HE)<sup>19</sup>. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (AxioCam ICc3, Zeiss, Alemanha), com avaliação duplo-cega (aumento de 20 $\times$ ), considerando-se inflamação, hemorragia, congestão vascular e edema.

### Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism® 8.0.

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey. A análise estatística da curva de mortalidade (curva de Kaplan Meier) foi realizada utilizando-se o teste de Teste de *Log-rank* (Mantel-cox). O nível mínimo de significância aceito foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Caracterização das nanopartículas

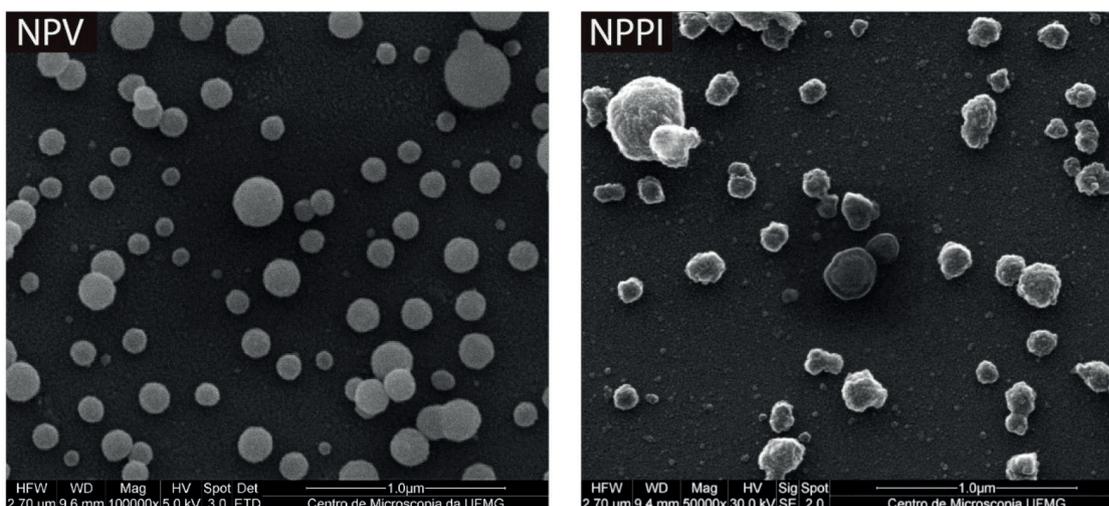
Apesar da pequena diferença entre os protocolos de síntese das nanopartículas vazias (NPV) e das que continham poli I:C (NPPI), observou-se variação nos parâmetros físico-químicos entre ambas as formulações (Tabela 1). Pela técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS), verificou-se que as NPPI apresentaram diâmetro médio de  $497 \pm 140,4$  nm e índice de polidispersão (PDI) de  $0,38 \pm 0,06$ . O potencial zeta médio foi de  $-33,66 \pm 3,93$  mV. Por sua vez, as NPV apresentaram diâmetro médio de  $261,7 \pm 17,25$  nm, PDI de  $0,29 \pm 0,08$  e potencial zeta de  $-32$  mV. A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (Figura 1) revelou que as NPPI possuem superfície mais rugosa e formato menos regular, enquanto as NPV apresentaram maior esfericidade e superfície lisa.

**Tabela 1** – Aspectos físico-químicos caracterizados das formulações NPV e NPPI

Tipo de NP	Diâmetro médio (nm)	Potencial zeta (mV)	Índice de polidispersão
NPV	$261,7 \pm 17,25$	-32	$0,29 \pm 0,08$
NPPI	$497 \pm 140,4$	$-33,66 \pm 3,93$	$0,38 \pm 0,06$

Fonte: os autores, 2024.

**Figura 1** – Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas produzidas. Nos quadros, são comparadas as morfologias de cada formulação de nanopartícula utilizada a partir de fotomicrografia eletrônica. As imagens são referidas como: nanopartículas vazias (NPV), as quais apresentam superfície lisa e regular; nanopartículas com poli I:C (NPPI), as quais apresentam superfície mais rugosa e formato mais irregular.



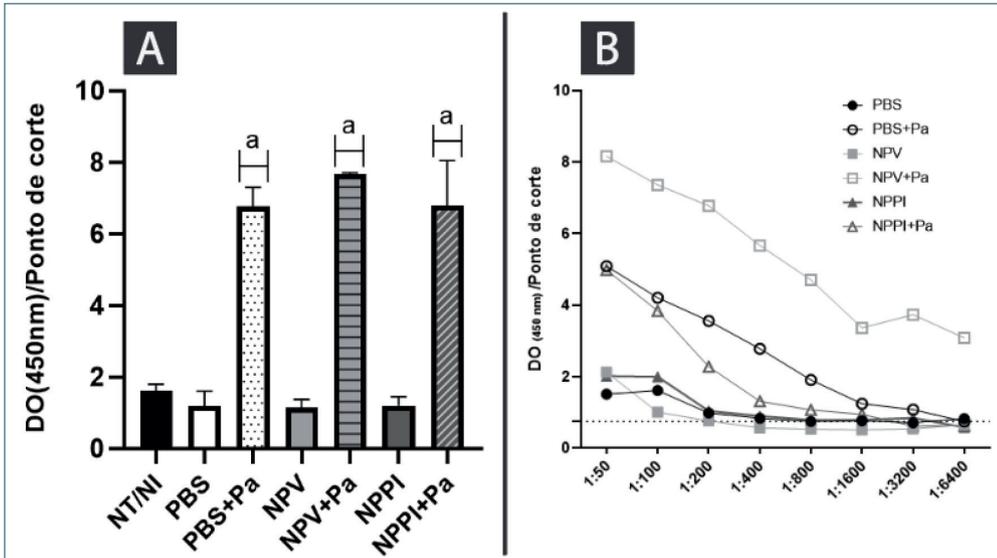
Fonte: os autores, 2024.

### Ensaios de imunização e titulação de anticorpos IgG séricos anti-*P. aeruginosa*

Os ensaios de imunização (Figura 2A) revelaram que houve uma produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* mais significativa nos animais dos grupos PBS+Pa, NPV+Pa e NPPI+Pa, em comparação com os grupos de controle

(NT/Ni e PBS). Entretanto, em nenhum dos grupos experimentais, foi possível identificar a produção de anticorpos IgM e IgA anti-*P. aeruginosa* nos soros dos animais imunizados. A titulação dos anticorpos (Figura 2B) evidenciou que os grupos com associação às proteínas totais da bactéria (PTPa) apresentaram os maiores títulos de IgG.

**Figura 2** – Avaliação de produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* séricos. A figura apresenta a quantificação dos níveis de anticorpos séricos no sangue dos camundongos imunizados ou não com as formulações de NPs ou PTPa. A) Os maiores índices de anticorpos foram evidenciados em PBS+Pa, NPV+Pa e NPPI+Pa, sendo que esses grupos não foram diferentes estatisticamente e diferentes dos demais (a). B) Titulação dos anticorpos séricos, mostrando maiores níveis em animais sensibilizados com PTPa com ou sem associação de NP.



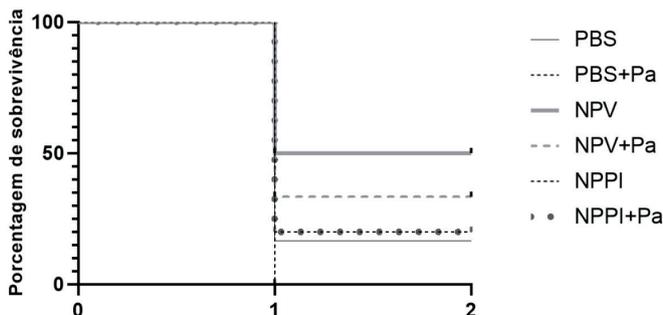
Fonte: os autores, 2024.

### Taxa de mortalidade dos animais desafiados com *P. aeruginosa*

Após a imunização dos animais, procedeu-se com o desafio deles com a *P. aeruginosa* PA14. Logo nas primeiras 24 horas, foi verificado que a maior parte dos animais, de todos os grupos, não resistiram à infecção (Figura 3). As taxas de sobrevivência, após o período máximo estipulado de 48 horas, foram, respectivamente:

PBS+Pa 0%, PBS 16,6%, NPPI e NPPI+Pa 20%, NPV+Pa 33,3% e NPV 50%, sendo esses valores não significativos nas estatísticas de sobrevivência dos grupos por meio da análise Log-rank. A análise da variação de pesos dos animais após o desafio (Figura 4) demonstrou que todos os animais apresentaram redução de peso pós-infecção, sem diferenças estatísticas entre todos os grupos.

**Figura 3** – Curva de mortalidade de animais desafiados por *P. aeruginosa*. Na figura, são representadas as taxas de sobrevivência dos grupos de animais submetidos ao desafio com *P. aeruginosa* no intervalo de dois dias. Após o período do experimento, os animais sobreviventes foram submetidos ao processo de eutanásia, e o material biológico devidamente processado.

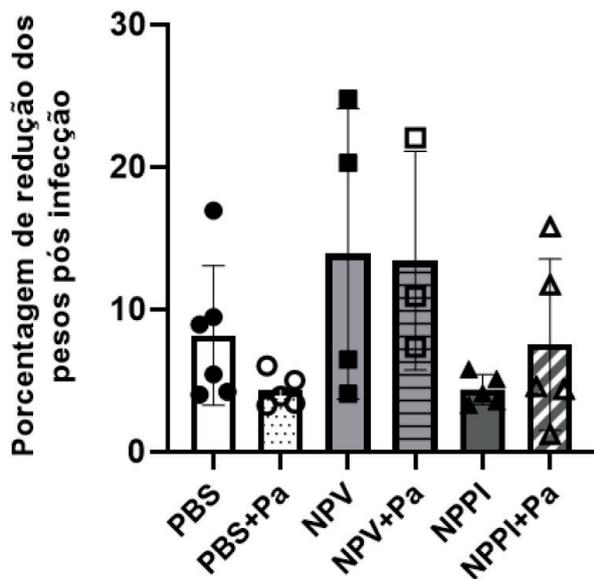


Fonte: os autores, 2024.

### Análise da variação de peso dos animais após o desafio por *P. aeruginosa*

Além da curva de mortalidade, a variação de pesos dos animais após o desafio (Figura 4) foi realizada como um meio de mensurar o efeito da infecção. Todos os animais apresentaram redução de peso depois da infecção, sendo as reduções percentuais médias por grupo: PBS = 8,19%; PBS+Pa = 4,35%; NPV = 13,92%; NPV+Pa = 13,45%; NPPI = 4,38%; e NPPI+Pa = 7,55%.

Figura 4 – Redução de peso dos animais, em porcentagem, ao longo do desafio por *P. aeruginosa*. A figura compara as variações individuais dos animais desafiados por *P. aeruginosa*. Todos os indivíduos apresentaram alguma redução de peso, e não houve variação significativa entre os grupos.



Fonte: os autores, 2024.

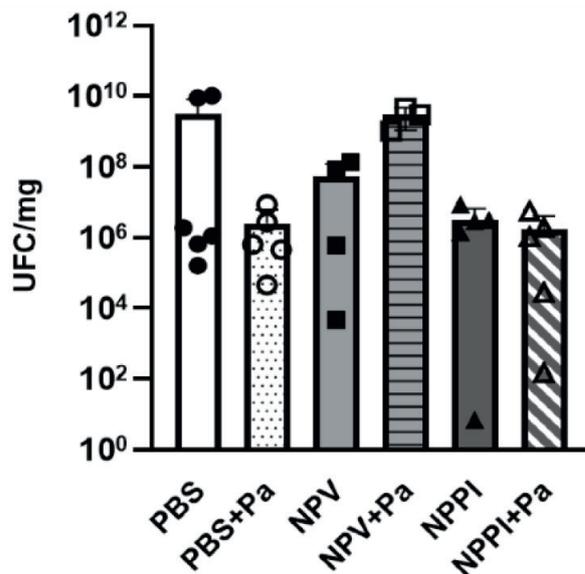
### Quantificação de UFC/mg em macerado pulmonar de animais desafiados com *P. aeruginosa*

A quantificação de carga bacteriana (Figura 5) foi realizada a partir do macerado pulmonar direito dos animais, com o propósito de avaliar a presença de *P. aeruginosa* nos órgãos. Os dados demonstram que não há diferenças estatísticas entre os grupos, pois não houve redução significativa de carga bacteriana nos pulmões dos animais desafiados.

### Ensaio de imunização de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* em macerado pulmonar

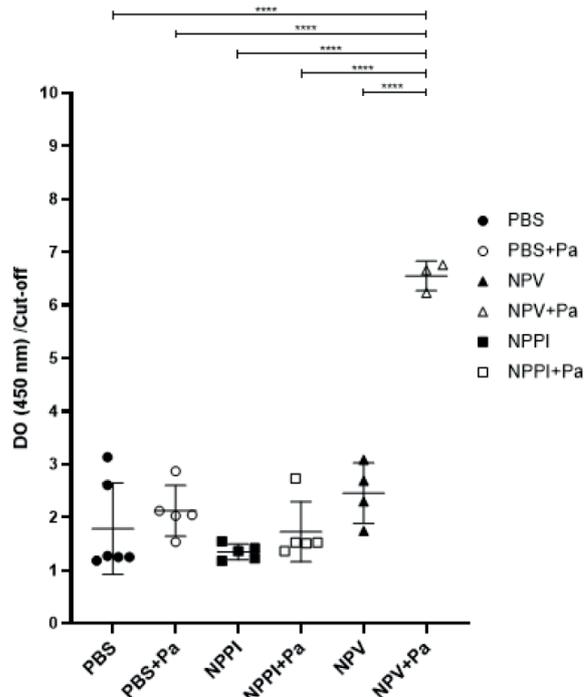
Os pulmões direitos macerados também foram utilizados com o propósito de verificar a presença de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*P. aeruginosa*. Nos macerados pulmonares, foi detectada a presença de IgG anti-*P. aeruginosa*, mas não de IgM ou IgA. O grupo NPV+Pa apresentou os níveis mais elevados de IgG, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ), conforme é mostrado na Figura 6.

Figura 5 – Quantificação de UFC/mL em pulmões de animais desafiados por *P. aeruginosa*. A figura mostra as cargas bacterianas individuais nos animais sem variação estatística entre grupos.



Fonte: os autores, 2024.

Figura 6 – Avaliação de produção de anticorpos IgG anti-*P. aeruginosa* em tecido pulmonar. As quantidades de anticorpos IgG foram mais expressivas em NPV+Pa, havendo variações estatísticas entre os demais grupos (\*\*\*\*).



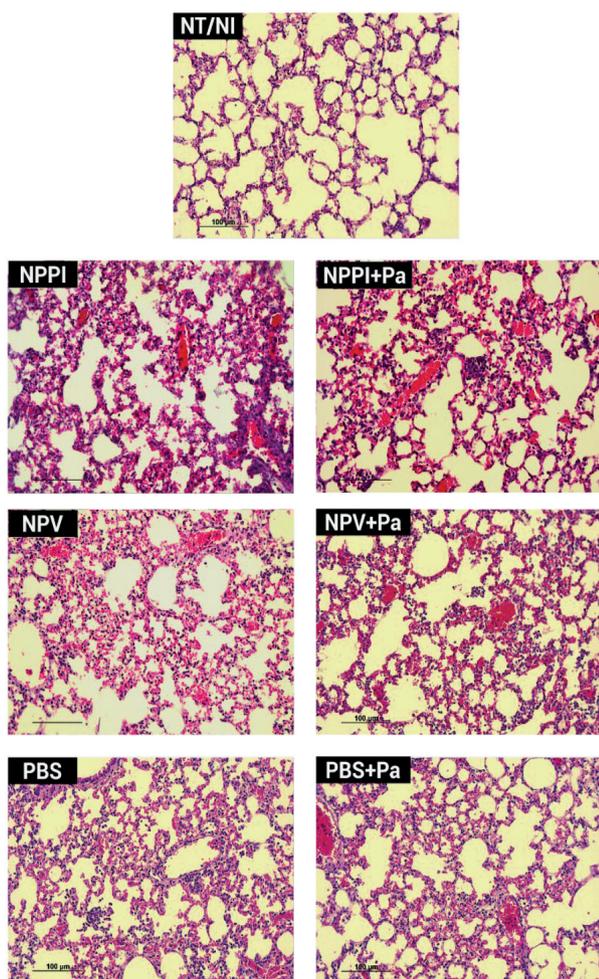
Fonte: os autores, 2024.

### Análise histopatológica

Os pulmões esquerdos foram utilizados para análise histopatológica (Figura 7), a fim de verificar danos na

estrutura do tecido decorrentes da infecção. As imagens histológicas dos pulmões (Figura 7) revelaram espessamento alveolar, presença de infiltrado inflamatório, hemorragia e congestão vascular, principalmente nos grupos NPPI, NPPI+Pa e NPV.

**Figura 7** – Análise histopatológica de animais desafiados por *P. aeruginosa*. O grupo NT/NI apresenta uma arquitetura pulmonar preservada, enquanto os demais grupos possuem danos teciduais expressivos. São comuns, nos grupos NPPI, NPPI+Pa, NPV, NPV+Pa, PBS e PBS+Pa, a presença de pontos inflamatórios e de hemorragia, além de vasos congestionados e perda da arquitetura pulmonar, com espessamento dos septos alveolares.



Fonte: os autores, 2024.

## DISCUSSÃO

No delineamento das NPs como sistema de entrega, devem ser levadas em conta as propriedades dos materiais utilizados, assim como as propriedades físicas do sistema após o processo de síntese. Os sistemas de entrega constituídos por proteínas apresentam diversas vantagens e aplicações no transporte de fármacos antitumorais, fatores de crescimento e nucleotídeos,

por exemplo<sup>20</sup>. Quanto aos aspectos físicos, NPV e NPPI apresentaram morfologia esférica (Figura 1), conforme é descrito em outros trabalhos com NPs de BSA<sup>11-13,21</sup>. Além da morfologia, a determinação das dimensões, das cargas elétricas e do PDI é essencial para a caracterização e a avaliação das NPs como sistemas de entrega (Tabela 1). Em relação ao diâmetro, as NPPI apresentaram média de  $497 \pm 140,4$  nm, enquanto as NPV mostraram dimensões consideravelmente menores, em torno de  $261,7 \pm 17,25$  nm. Apesar da divergência entre os tamanhos das NPs, as formulações ainda estão dentro do espectro descrito em outros estudos<sup>11-13,21</sup>. As dimensões finais das NPs podem variar em função de fatores como pH da solução, temperatura do sistema, concentração de proteínas na amostra, método de síntese, entre outros. Em uma revisão compilando diferentes métodos de síntese de NPs de albumina, Srivastava, Prajapati<sup>21</sup> (2020) relataram intervalo de dimensões entre 100 e 300 nm. O encapsulamento de moléculas é outro fator que pode aumentar o tamanho das NPs, o que pode explicar o aumento significativo do diâmetro das NPPI em relação às NPV, considerando que a única diferença entre os protocolos de síntese foi a adição de poli I:C.

As dimensões de uma nanopartícula influenciam como ela será apresentada e processada pelo sistema imune. NPs com dimensões entre 20 e 200 nm são internalizadas por células dendríticas residentes nos linfonodos por endocitose mediada por clatrina e (ou) caveolina. Por outro lado, NPs com dimensões entre 500 e 1000 nm podem ser processadas por células dendríticas migratórias por fagocitose e (ou) macropinocitose<sup>22</sup>. Ainda que existam diferentes formas de recepção pelo sistema imune, um dos principais desafios no delineamento de sistemas de entrega é garantir sua permanência nos tecidos por tempo suficiente para induzir a resposta imunológica, evitando sua eliminação precoce pela corrente sanguínea<sup>22</sup>.

A diferença de potencial elétrico das NPs, por sua vez, é determinada pelo valor de potencial zeta. Para valores de  $\pm 30$  mV, as nanopartículas apresentam boa estabilidade e menor tendência à agregação<sup>23</sup>. Assim, com NPPI apresentando  $-33,66$  mV e NPV  $-32$  mV, observa-se que ambas se encontram dentro da faixa de estabilidade aceitável. O PDI é um parâmetro que mede a homogeneidade do tamanho das NPs. Para valores entre 0,1 e 0,25, a distribuição de tamanhos é considerada estreita, enquanto valores acima de 0,5 indicam ampla dispersão<sup>24</sup>. Ambas as formulações podem ser consideradas de distribuição parcialmente homogênea, com NPPI =  $0,38 \pm 0,06$  e NPV =  $0,29 \pm 0,08$ .

A caracterização das NPs é importante para o delineamento do sistema como adjuvante, pois pode resultar em efeito sinérgico com as PTPa, aumentando o potencial de imunização. Após a finalização do protocolo de imunização, o sangue dos animais foi coletado para análise da produção de anticorpos. A via de imunização escolhida foi a nasal, por se tratar de uma região vascu-

larizada, com boa absorção e baixa atividade enzimática, sendo essas características favoráveis à indução de resposta imune. Em camundongos, existe o tecido linfoide associado à mucosa nasal (NALT), sítio primário de indução de imunidade contra antígenos. Nessa região do trato respiratório, encontram-se estruturas especializadas, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos, que promovem a ativação da imunidade local. Em termos de produção de imunoglobulinas, o epitélio nasal está associado, principalmente, à produção de IgA e IgG, com menor produção de IgM e IgE<sup>25-27</sup>. Conforme foi verificado nos ensaios de ELISA (Figura 2), houve produção de IgG sérico, especialmente nos grupos PBS+Pa, NPPI+Pa e NPV+Pa, os quais tiveram contato direto com os antígenos bacterianos. Em contraste, as NPs isoladas não apresentaram efeito imunogênico relevante. No entanto, a quantificação de IgA e IgM não indicou sensibilização, sugerindo que a imunização não estimulou efetivamente uma resposta de mucosa, como era esperado. Morais et al.<sup>12</sup> (2018), ao investigar a imunização subcutânea com NPs de BSA, também observou maior produção de IgG em formulações que continham proteínas da bactéria, enquanto o uso de NPs isoladas gerou níveis mais baixos. Rodrigues et al.<sup>11</sup> (2013) observou comportamento semelhante com fêmeas imunizadas por via subcutânea com NPs de BSA.

O poli I:C é um adjuvante que pode aumentar a resposta imune, mas também pode induzir inflamação e sintomas compatíveis com *sickness behavior*, dependendo da dosagem<sup>28</sup>. Isso se deve a seu caráter de análogo de RNA de fita dupla, que ativa componentes do sistema imune, simulando uma infecção viral<sup>28</sup>. Nessa condição, os animais podem apresentar diminuição da locomoção, aumento da temperatura corporal e redução da ingestão alimentar, o que pode se refletir em perda de peso<sup>28</sup>. Durante as três doses de imunização, os animais não apresentaram tendência à perda de peso, sugerindo que a formulação não induziu inflamação exacerbada.

Após a verificação da produção de anticorpos, os animais foram desafiados com *P. aeruginosa* para avaliação da eficácia protetora dos imunizantes. Em pacientes com fibrose cística ou infecções pulmonares agudas, é comum observar perda de peso associada à inflamação pulmonar e à dificuldade de combate ao patógeno. Esse comportamento também é observado em modelos animais<sup>29</sup>. Ao investigar os efeitos crônicos da infecção por *P. aeruginosa*, Van Heeckeren et al.<sup>29</sup> (2000) utilizou inóculo de  $6,5 \times 10^4$  UFC em esferas de agarose implantadas diretamente no pulmão direito dos animais. Embora o número de bactérias tenha sido 1000 vezes menor do que neste estudo, o fato de o inóculo ser depositado diretamente no pulmão elimina a necessidade de colonização inicial do trato respiratório. Van Heeckeren observou perda de peso máxima de  $13,7 \pm 1,3\%$  após três dias, enquanto, neste trabalho, as médias

variaram entre 4,35% e 13,45% em apenas dois dias (Figura 4). Em relação à mortalidade, observou-se taxa geral acima de 80% nas primeiras 24 horas (Figura 3), ao passo que Morais et al.<sup>12</sup> (2018), utilizando protocolo semelhante, obteve 50% de sobrevivência em 48 horas, com a formulação NP+PTPa. Esses dados sugerem que os animais imunizados neste trabalho foram sensíveis à infecção e apresentaram baixa resistência. Comparativamente, Morais obteve melhores taxas de sobrevivência com formulação semelhante, sendo a via de administração (intranasal *versus* subcutânea) o principal fator diferencial<sup>12</sup>.

As análises pulmonares confirmaram os danos decorrentes da infecção. A quantificação de UFC nos pulmões (Figura 5) não revelou diferenças estatísticas entre os grupos, indicando que nenhum imunizante foi eficaz na redução da carga bacteriana. Essa hipótese é reforçada pelos dados de produção de IgG anti-*P. aeruginosa* nos pulmões (Figura 6), os quais mostram que, mesmo com expressão de anticorpos nos tecidos, os grupos com maiores níveis (como NPV+Pa) também apresentaram alta carga bacteriana e perda de peso. A análise histopatológica (Figura 7) confirmou a ocorrência de danos pulmonares severos, como destruição do epitélio, hemorragia, infiltrado inflamatório e edema, semelhantes aos descritos por Zhu et al.<sup>30</sup> (2021), que avaliou o dano induzido por oito cepas de *P. aeruginosa* em infecção unilateral. As cepas mais virulentas se disseminaram para o pulmão não inoculado, induzindo mortalidade em menos de 24 horas. As lesões observadas incluíram hemorragia, edema e infiltração de neutrófilos<sup>30</sup>. Em contraponto, Rodrigues et al.<sup>11</sup> (2013) e Morais et al.<sup>12</sup> (2018) relataram melhor preservação do epitélio pulmonar em animais imunizados por via subcutânea com NPs associadas a epítomos bacterianos.

Em síntese, os resultados obtidos demonstram que, embora as nanopartículas de albumina contendo ou não poli I:C tenham apresentado características físico-químicas compatíveis com sistemas vacinais e induzido a produção de anticorpos IgG específicos contra *P. aeruginosa*, a imunização intranasal não foi eficaz em conferir proteção aos animais desafiados. A elevada taxa de mortalidade, a manutenção da carga bacteriana nos pulmões e os extensos danos teciduais observados indicam que, apesar da imunogenicidade das formulações, a via de administração foi um fator limitante para o sucesso da resposta protetora nesse modelo agudo de infecção. Esses achados reforçam a importância da escolha adequada da via de imunização no desenvolvimento de vacinas baseadas em nanopartículas para doenças respiratórias. Além disso, reforça-se o fato de que, até o momento, não há relatos de formulações do tipo NPPI em modelo de vacinação contra *P. aeruginosa*, o que faz com que os protocolos de síntese e administração sejam ajustados, a fim de se continuar uma investigação

da eficácia do adjuvante nanoparticulado.

## CONCLUSÃO

Os imunostimulantes baseados em nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA), com ou sem a associação do ácido polininosínico:policitidílico (poli I:C), apresentaram boa estabilidade química, além de características morfológicas e físico-químicas compatíveis com sistemas vacinais descritos na literatura. As formulações também foram capazes de induzir a produção de anticorpos IgG específicos contra *Pseudomonas aeruginosa*, tanto no soro quanto no tecido pulmonar dos animais imunizados, sem provocar perda de peso durante o protocolo de imunização.

Contudo, apesar da resposta humoral induzida, os anticorpos gerados não conferiram proteção efetiva frente ao desafio com *P. aeruginosa*. Os animais imunizados apresentaram alta taxa de mortalidade, perda de peso significativa, elevada carga bacteriana nos pulmões e importantes alterações histopatológicas. Em comparação com estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, que demonstraram taxas superiores de proteção e sobrevida com formulações vacinais semelhantes, a principal diferença observada foi a via de administração utilizada. Logo, há uma necessidade de se estudar novas formas para síntese e imunização, uma vez que ainda não há relatos de aplicação de formulações de NPS de BSA associadas com Poli I:C para esse tipo de infecção.

Dessa forma, conclui-se que, embora as formulações baseadas em NPs tenham se mostrado imunogênicas, a imunização pela via intranasal não promoveu efeito protetivo significativo contra a infecção pulmonar por *P. aeruginosa* neste modelo agudo. Assim, a escolha da via de administração se destaca como fator determinante no desempenho de vacinas experimentais baseadas em nanopartículas, especialmente para o enfrentamento de patógenos respiratórios.

## REFERÊNCIAS

- Murray PD, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2011. 948 p.
- Giovagnorio F, De Vito A, Madeddu G, Parisi SG, Geremia N. Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A Narrative Review of Antibigram Interpretation and Emerging Treatments. *Antibiotics* (Basel). 2023 Nov 12;12(11):1621. doi: 10.3390/antibiotics12111621
- Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Front Microbiol*. 2024 Apr 5;15:1374466. doi: 10.3389/fmicb.2024.1374466
- Labovská S. *Pseudomonas aeruginosa* as a Cause of Nosocomial Infections. *Pseudomonas aeruginosa - Biofilm Formation, Infections and Treatments*. IntechOpen; 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.95908>
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic

strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan-Feb;37(1):177-92. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

6. World Health Organization -WHO. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017. 87 p.

7. World Health Organization -WHO. Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. 72 p.

8. Killough M, Rodgers AM, Ingram RJ. *Pseudomonas aeruginosa*: Recent Advances in Vaccine Development. *Vaccines* (Basel). 2022 Jul 8;10(7):1100. doi: 10.3390/vaccines10071100

9. Zhao T, Cai Y, Jiang Y, He X, Wei Y, Yu Y, et al. Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 July 19;8(1):283. doi: 10.1038/s41392-023-01557-7

10. De Waele J, Verhezen T, van der Heijden S, Berneman ZN, Peeters M, Lardon F, et al. A systematic review on poly(I:C) and poly-ICLC in glioblastoma: adjuvants coordinating the unlocking of immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Jun 25;40(1):213. doi: 10.1186/s13046-021-02017-2

11. Rodrigues NF, Bernardes ETV, Rocha RP, Costa LC da, Coutinho AC, Muniz M dos S, et al. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Vaccine*. 2013 Oct 17;31(44):5062-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.08.078

12. Morais SM de S, Rodrigues NF, Silva NIO da, Salvador EA, Franco IR, Souza GAP de, et al. Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Vaccine*. 2018 Oct 15;36(43):6408-15. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.070

13. Piva-Amaral R, Souza GAP de, Vieira Júnior JCV, Castro RFG de, Gozzi WP, Lima Neto SP, et al. Bovine serum albumin nanoparticles containing Poly (I:C) can enhance the neutralizing antibody response induced by envelope protein of Orthoflavivirus zikaense. *Int Immunopharmacol*. 2024 Feb 15;128:111523. doi: 10.1016/j.intimp.2024.111523

14. Tanjung YP, Dewi MK, Gatera VA, Barliana MI, Joni IM, Chaerunisaa AY. Factors Affecting the Synthesis of Bovine Serum Albumin Nanoparticles Using the Desolvation Method. *Nanotechnol Sci Appl*. 2024 Jan 31;17:21-40. doi: 10.2147/NSA.S441324

15. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

16. Universidade Federal de São Paulo. Comissão de Ética no Uso dos Animais. Guia Anestesia e Analgesia em animais de laboratório. [200-]. p. 1-47.

17. Tang H, Kays M, Prince A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun*. 1995 Apr;63(4):1278-85. doi: 10.1128/iai.63.4.1278-1285.1995

18. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):3998-4004. doi: 10.1128/IAI.68.7.3998-4004.2000

19. Zhou X, Moore BB. Lung Section Staining and Microscopy. *Bio Protoc*. 2017 May 20;7(10):e2286. doi: 10.21769/BioProtoc.2286

20. Hong S, Choi DW, Kim HN, Park CG, Lee W, Park HH. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2020 June 29;12(7):604. doi: 10.3390/pharmaceutics12070604
21. Srivastava A, Prajapati A. Albumin and functionalized albumin nanoparticles: production strategies, characterization, and target indications. *Asian Biomed (Res Rev News)*. 2020 Dec 31;14(6):217-42. doi: 10.1515/abm-2020-0032
22. Priyanka, Abusalah MAH, Chopra H, Sharma A, Mustafa SA, Choudhary OP, et al. Nanovaccines: A game changing approach in the fight against infectious diseases. *Biomed Pharmacother*. 2023 Nov;167:115597. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115597
23. Serrano-Lotina A, Portela R, Baeza P, Alcolea-Rodríguez V, Villarroel M, Ávila P. Zeta potential as a tool for functional materials development. *Catalysis Today*. 2023;423:113862. doi: 10.1016/j.cattod.2022.08.004
24. Hoseini B, Jaafari MR, Golabpour A, Momtazi-Borojeni AA, Karimi M, Eslami S. Application of ensemble machine learning approach to assess the factors affecting size and polydispersity index of liposomal nanoparticles. *Sci Rep*. 2023 Oct 21;13(1):18012. doi: 10.1038/s41598-023-43689-4
25. Kehagia E, Papakyriakopoulou P, Valsami G. Advances in intranasal vaccine delivery: A promising non-invasive route of immunization. *Vaccine*. 2023 June 1;41(24):3589-603. doi: 10.1016/j.vaccine.2023.05.011
26. Mato YL. Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *Int J Pharm*. 2019 Dec 15;572:118813. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118813.
27. Ou Y, Wang Y, Yu T, Cui Z, Chen X, Zhang W, et al. Intranasal Vaccination with rePcrV Protects against *Pseudomonas aeruginosa* and Generates Lung Tissue-Resident Memory T Cells. *J Immunol Res*. 2022 Nov 26;2022:1403788. doi: 10.1155/2022/1403788
28. Cunningham C, Campion S, Teeling J, Felton L, Perry VH. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun*. 2007 May;21(4):490-502. doi: 10.1016/j.bbi.2006.12.007
29. Van Heeckeren AM, Tscheikuna J, Walenga RW, Konstan MW, Davis PB, Erokwu B, et al. Effect of *Pseudomonas* infection on weight loss, lung mechanics, and cytokines in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jan;161(1):271-9. doi: 10.1164/ajrccm.161.1.9903019
30. Zhu Y, Ge X, Xie D, Wang S, Chen F, Pan S. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Secrete LasB Elastase to Induce Hemorrhagic Diffuse Alveolar Damage in Mice. *J Inflamm Res*. 2021 Aug 6;14:3767-3780. doi: 10.2147/JIR.S322960

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível por meio da contribuição da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - APQ-04845-23; RED-00181-23), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 308468/2021-0; 408147/2022-9).

---

SUBMISSÃO: 07/07/2025

ACEITE: 29/07/2025