



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**INIBIÇÃO DA ADESÃO BACTERIANA POR NANOPARTÍCULAS
REVESTIDAS POR VESÍCULAS BACTERIANAS DE MEMBRANA
EXTERNA (OMV)**

Mariana Ottaiano Gonçalves

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Co-orientador:

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

* bolsista CNPq – 442065/2020-5

**São Carlos - SP
2023**

MARIANA OTTAIANO GONÇALVES

**INIBIÇÃO DA ADESÃO BACTERIANA POR NANOPARTÍCULAS
REVESTIDAS POR VESÍCULAS BACTERIANAS DE MEMBRANA
EXTERNA (OMV)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Co-orientador:

Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar

Profa. Dra. Ana Claudia Trocoli Torrecilhas

Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários - UNIFESP

Profa. Dra. Natália Noronha Ferreira Nadeo

Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia – IFSC-USP

São Carlos

2023

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Marlise e Marco, e meu irmão, Marcelo, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e me darem todos os recursos para que eu pudesse seguir meus sonhos. Obrigada por incentivarem meus estudos e principalmente, por todo amor que me dão.

À Paula, e especialmente a ela. Foi a pessoa que acreditou em mim desde o dia 01 e viu o potencial que eu tinha pra me tornar a melhor pesquisadora que eu podia ser. Obrigada por ter confiado nisso e ter feito todos os esforços que te cabiam pra me ensinar tudo sobre independência e autoconfiança. Quando eu crescer, quero ser igual a você!

Ao Xuxa, e ao Grupo GNano, que me deram a oportunidade de aprender sobre um mundo novo, com uma infraestrutura impecável, onde eu realmente me encontrei apaixonada pela pesquisa. Obrigada Simone, Bruna e Romeu por facilitarem o nosso trabalho. Obrigada aos colegas por terem me ensinado tanto.

À Giulia e à Luana pelo tanto que me ensinaram e contribuíram pro meu trabalho ser mais rico.

À Maju, Fer, Camila, Jéssica e Raquel, que dividiram comigo os trabalhos do dia-a-dia, mas que sempre deixaram tudo muito mais leve com muitas risadas e comidinhas gostosas no final do expediente.

Aos meus amigos, em especial Martelo, Milena, Dog, Marcelo, Bia, MP e Belém, pelo apoio incondicional, por vibrarem e chorarem junto comigo e pela amizade incrível que construímos em todos esses anos. Sem vocês, não tem Mary Jane.

Ao Handebol UFSCar, por ter sido sempre meu local de refúgio, de distração e de bons momentos, e por ter me ensinado todas as coisas que apenas o esporte (coletivo e universitário) ensina.

À Professora Cristina, Paulo Andrade e todos do LaMiB. Por terem me acolhido há muitos anos e me dado todas as condições possíveis para que eu pudesse fazer meu trabalho.

Ao Professor Elson Longo, que confiou em mim desde a época da graduação com uma parceria incrível e permitiu que eu pudesse começar meu mestrado com auxílio financeiro.

Agradeço o apoio e financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – (442065/2020-5)

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional.

Gonçalves, Mariana Ottaiano. **Inibição da adesão bacteriana por nanopartículas revestidas por vesículas bacterianas de membrana externa (OMV)**. 2023. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2023.

RESUMO

A resistência a antibióticos é uma ameaça global à saúde. Para combater microrganismos resistentes, é crucial encontrar alternativas naturais com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Uma abordagem inovadora envolve revestir nanopartículas com membranas biológicas, transferindo suas propriedades e ativando respostas imunológicas, potencialmente reduzindo infecções multirresistentes. As vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs) são estruturas esféricas, não-replicativas, naturalmente produzidas a partir da membrana externa de espécies Gram-negativas, que permitem a herança de características naturais da bactéria, e que podem competir com sítios de ligação e assim inibir a adesão bacteriana nas células hospedeiras. Neste trabalho, sintetizamos nanomateriais terapêuticos a base de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) revestidos por OMVs a fim de avaliar sua interação *in vitro* entre patógeno e hospedeiro, e suas potenciais aplicações na nanomedicina. Não houve diferenças significativas em estrutura ou propriedades físico-químicas de OMVs isoladas de *K. pneumoniae* em diferentes condições de cultivo bacteriano. Paralelamente, nanopartículas de PLGA foram sintetizadas a partir da técnica de nanoprecipitação com diferentes marcadores fluorescentes. As partículas apresentaram tamanho variando entre 100 e 220 nm e carga superficial variando entre -30 e -35 mV. Em seguida, as partículas foram revestidas com as vesículas extraídas através de sonicação e os nanocarreadores revestidos apresentaram tamanho de 200 nm e rendimento de 1×10^{10} part/mL. Por fim, esses nanocarreadores foram testados com relação à internalização em células hospedeiras e patogênicas e à capacidade anti-adesão em células pulmonares. Nossos resultados preveem uma habilidade dos nanocarreadores em prevenir a adesão bacteriana em células pulmonares em determinados tempos, concentrações e tipos de incubação. Esses resultados poderão auxiliar o entendimento de como nanomateriais híbridos se comportam diante do hospedeiro e do patógeno, e trazer importantes benefícios para o desenvolvimento da nanomedicina.

Palavras-chave: vesículas bacterianas de membrana externa; resistência microbiana; pneumonia bacteriana; nanopartículas.

Gonçalves, Mariana Ottaiano. Inhibition of bacterial adhesion by nanoparticles coated with bacterial outer membrane vesicles (OMV) 2023. Master Degree in Biotechnology Graduation Program. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2023.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a global health threat. To combat resistant microorganisms, it is crucial to find natural alternatives with antimicrobial and anti-inflammatory properties. An innovative approach involves coating nanoparticles with biological membranes, transferring their properties and activating immune responses, potentially reducing multidrug-resistant infections. Bacterial outer membrane vesicles (OMVs) are spherical, non-replicating structures, naturally produced from the outer membrane of Gram-negative species, which allow the inheritance of natural characteristics of the bacteria, and which can compete with binding sites and thus inhibit bacterial adhesion on host cells. In this work, we synthesized therapeutic nanomaterials based on poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) coated by OMVs in order to evaluate their *in vitro* interaction between pathogen and host, and their potential applications in nanomedicine. There were no significant differences in structure or physicochemical properties of OMVs isolated from *K. pneumoniae* under different bacterial cultivation conditions. In parallel, PLGA nanoparticles were synthesized using the nanoprecipitation technique with different fluorescent markers. The particles had a size ranging between 100 and 220 nm and a surface charge ranging between -30 and -35 mV. Then, the particles were coated with the vesicles extracted through sonication and the coated nanocarriers had a size of 200 nm and a yield of 1×10^{10} part/mL. Finally, these nanocarriers were tested for internalization in host and pathogenic cells and anti-adhesion capacity in lung cells. Our results predict an ability of nanocarriers to prevent bacterial adhesion in lung cells in certain times, concentration and types of incubation. These results may help to understand how hybrid nanomaterials behave towards the host and the pathogen, and bring important benefits to the development of nanomedicine.

Key words: bacterial outer membrane vesicles; microbial resistance; bacterial pneumonia; nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Microambiente da infecção pulmonar em pacientes com quadro de pneumonia bacteriana. Fonte: pela autora. Criado com BioRender.com.....15
- Figura 2. Estrutura da membrana bacteriana e biogênese das OMVs. Podem ser observadas as camadas bacterianas mais importantes, como lipopolissacarídeo (LPS), membrana externa (OM), camada de peptidoglicano (PG) e membrana interna (IM). As OMVs brotam a partir da membrana externa, preservando algumas características estruturais, ao mesmo tempo que variam a carga interna. Fonte: pela autora. Criado com BioRender.com.....17
- Figura 3. Representação esquemática mostrando as (A) diferentes condições de cultivo testadas para verificar cada influência na biogênese da OMV, onde 1) é a comparação entre duas cepas diferentes de *Klebsiella pneumoniae*; 2) é o isolamento de OMV em diferentes estágios do crescimento bacteriano; 3) comparação entre diferentes épocas da cultura; 4) comparação de três meios de cultura diferentes; e 5) diferentes condições de troca gasosa. (B) Processo de isolamento para obtenção dos resultados discutidos neste estudo, iniciado após as condições de cultivo apresentadas acima. Fonte: pela autora. Criado com BioRender.com.....31
- Figura 4. Características de OMVs isoladas de duas cepas diferentes de *K. pneumoniae* cultivadas nas mesmas condições. Os OMVs foram isolados dos sobrenadantes de quantidades iguais de células, com base em OD600 de *K. pneumoniae* ATCC 1706 (azul claro) e *K. pneumoniae* A54970 (azul escuro) e analisados em termos de (A) rendimento (OMV/mL), (B) tamanho médio (nm) e (C) modo de tamanho (nm), medido por NTA; (D) quantificação da proteína obtida a partir do ensaio BCA e (E) SDS-Page, que mostra as bandas de OMV correspondentes às da bactéria parental, nas dimensões de OMPs da literatura. As barras representam valores médios com erros padrão de três réplicas biológicas. Não houve diferença estatística entre os grupos. As imagens SEM mostram a morfologia das OMVs de (F) *K. pneumoniae* ATCC 1706 e (G) *K. pneumoniae* A54970. Fonte: pela autora.....33
- Figura 5. Avaliação das características das OMVs isoladas de ambas as cepas de *K. pneumoniae* em diferentes estágios de cultivo. (A) e (B) Rendimento (OMV/mL); (C) Média dos tamanhos (nm); (D) Modo de tamanhos (nm), medido por NTA e (E) potencial zeta de OMVs, medido por Zetasizer (n=3, triplicata biológica) (Dados representados por média \pm erro padrão). Não houve diferenças estatísticas. Significâncias dos dados analisadas por teste de Welch usando GraphPad Prism 8. Fonte: pela autora.....35
- Figura 6. Após 24 horas de cultivo em meio BHI sob agitação a 37°C, as OMVs mantiveram os valores de quantidade produzida e tamanho. Características das OMVs isoladas de ambas as cepas de *K. pneumoniae* cultivadas por diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas), expressas em (A) quantidade (OMV/mL) e (B) tamanho médio (nm), representadas por pontos, e modo de tamanho (nm), representado por barras, medido por NTA e (C) teor de proteína, medido por ensaio de BCA. (n=3, triplicado biológico). Dados representados por média \pm erro padrão. Significâncias dos dados analisadas por variância (ANOVA) usando GraphPad Prism 8. As significâncias são indicadas por * para P-Value < 0,05 e ** para P-Value < 0,01. Fonte: pela autora...37

- Figura 7. Meios de cultura com diferentes composições induzem a produção de OMV com diferenças no teor de proteína. (A) Rendimento (OMV/mL) e (B) tamanho (representado por pontos) e tamanho do modo (representado por barras), medido por NTA, e (C) teor de proteína obtido por ensaio de BCA do processo de extração de OMVs de ambas as estirpes de *K. pneumoniae* cultivadas em meios de cultura Luria Bertani (LB), Mueller-Hinton (MH) e Brain-Heart Infusion (BHI) (n=3, triplicata biológica). Dados representados por média \pm erro padrão. Significâncias dos dados analisadas por variância (ANOVA) usando GraphPad Prism 8. As significâncias são indicadas por * para P-Value < 0,05 e ** para P-Value < 0,01. Fonte: pela autora...39
- Figura 8. A disponibilidade de oxigênio durante o cultivo interfere na secreção de OMVs no meio. Rendimento (OMV/mL) e, tamanho (pontos) e tamanho do modo (barras) medidos por NTA, do processo de extração de OMVs de ambas as cepas de *K. pneumoniae* cultivadas em (A) tubo de ensaio de 15 mL e (B) 6- placa de poço a 37°C sob agitação a 150 rpm, cultura estática (estática) e em incubadora com 5% de CO₂ (n=3, triplicata biológica). Dados representados por média \pm erro padrão. Significâncias dos dados analisadas por variância (ANOVA) usando GraphPad Prism 8. As significâncias são indicadas por * para P-Value < 0,05. Fonte: pela autora.....40
- Figura 9. Representação esquemática da síntese de nanopartículas poliméricas carregadas com curcumina, obtidas pelo método de nanoprecipitação, e revestidas por vesículas de membrana externa extraídas de cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Fonte: pela autora. Criada com BioRender.....47
- Figura 10. As propriedades físico-químicas da nanopartícula são alteradas conforme a etapa de funcionalização. Comparação de (A) Rendimento (OMV/mL), (B) Tamanho (nm) e (C) Carga superficial (mV) das nanopartículas de PLGA com curcumina (PLGA-Cur), PLGA com Rhodamina B (PLGA-Rho), OMVs não funcionalizadas (OMV), nanocarreadores de PLGA com curcumina revestidas por OMV na proporção 1:2 (OM-NP Cur) e concentradas (OM-NP Rho). (n=3, triplicata biológica). Dados representados por média \pm erro padrão. Dados analisados por análise de variância (ANOVA). Significâncias estão indicadas por * para P-Value < 0,05; ** para P-Value < 0,01; *** para P-Value < 0,001; e **** para P-Value < 0,0001. Fonte: pela autora.....50
- Figura 11. Características estruturais são alteradas com a funcionalização dos nanocarreadores. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de (A) Nanopartículas de PLGA; (B) Nanopartículas de PLGA com Curcumina (PLGA-Cur); (C) Nanopartículas de PLGA com Rhodamina; (D) OMV extraída de *K. pneumoniae* ATCC 1706; (E) Nanocarreadores de PLGA revestidos por OMV (OM-NC). (G-I) Morfologia dos nanocarreadores de PLGA funcionalizados com revestimento de OMVs bacterianas (OM-NC). Imagens de Microscopia Eletrônica Criogênica.....51
- Figura 12. Atividade antimicrobiana de OM-NCs carregadas com Curcumina contra *K. pneumoniae* ATCC 1706 não atinge a mínima concentração inibitória. Na parte superior, os gráficos mostram a porcentagem de morte de *K. pneumoniae* ATCC 1706 das OM-NCs carregadas com Curcumina (azul), comparadas com diferentes concentrações de curcumina livre (laranja) e gentamicina livre (preto) para ensaios

(A) sem luz e (B) com luz irradiada. (C) Gráfico representando o ensaio de viabilidade bacteriana ao longo de 24 horas para diferentes concentrações de OM-NC carregadas de Curcumina. Fonte: pela autora.....59

Figura 13. A internalização da nanopartícula revestida apresenta diferenças em comparação com as nanopartículas poliméricas sem revestimento. Histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo para internalização das nanopartículas sem revestimento nos canais (A) FL-2 e (B) FL-3; e para as nanopartículas revestidas (OM-NCs) nos canais (D) FL-2 e (E) FL-3 em células A549 incubadas por 2 (verde), 6 (laranja) e 24 horas (vermelho). Foi adicionado um traço de referência para efeito de comparação. Nos gráficos (C) e (F), estão representadas as médias geométricas relativas da internalização das nanopartículas e dos nanocarreadores, respectivamente, obtidas após a normalização da média geométrica da citometria de fluxo com a medida de fluorescência de PLGA-Rho e OM-NCs nos canais FL-1, FL-2 e FL-3. (G) Gráfico de viabilidade celular calculado por contagem de células após o tratamento das células A549 com PLGA-Rho (em rosa) ou OM-NCs (em cinza). Dados representados por média \pm erro padrão. Dados analisados por análise de variância (ANOVA). Significâncias estão indicadas por ** para P-Value $< 0,01$; *** para P-Value $< 0,001$; **** para P-Value $< 0,0001$. Fonte: pela autora.....61

Figura 14. Efeito similar observado na internalização das nanopartículas em relação às células de macrófago Raw 264.7. Histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo para internalização das (A) nanopartículas sem revestimento e (B) para as nanopartículas revestidas (OM-NCs) no canal FL-2 em células Raw 264.7 incubadas por 2 (verde), 6 (laranja) e 24 horas (vermelho). Foi adicionado um traço de referência para efeito de comparação. No gráfico (C), está representada a média geométrica obtida neste canal em relação às PLGA-Rho e OM-NCs. representadas as médias geométricas relativas da internalização das nanopartículas e dos nanocarreadores. Dados representados por média \pm erro padrão. Dados analisados por análise de variância (ANOVA). Significâncias estão indicadas por * para P-Value $< 0,05$. Fonte: pela autora.....62

Figura 15. As características de cada espécie bacteriana interferem na internalização das nanopartículas. Histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo para internalização das nanopartículas sem revestimento (PLGA-Rho) e para as nanopartículas revestidas (OM-NCs) no canal FL-2 em incubação por 90 minutos em cepas bacterianas (A) *K. pneumoniae*, (B) *Streptococcus pneumoniae* e (C) *Pseudomonas aeruginosa*. Foi adicionado um traço de referência para efeito de comparação. Fonte: pela autora.....63

Figura 16. Representação esquemática dos regimes de incubação utilizados nos testes anti-adesão para análise em Microscopia Confocal de Fluorescência. No Regime de Pré-Incubação, as OM-NCs foram adicionadas à cultura de células A549 antes do input bacteriano. No Regime Competitivo, os dois sistemas foram adicionados simultaneamente à cultura de células pulmonares. E por fim, no Regime Competitivo, o cultivo bacteriano foi acrescido antes da adição dos nanocarreadores terapêuticos. Após os tratamentos, os sistemas foram montados em lâminas e analisadas em microscópio confocal.

Figura 17. Em Regime de Pré-Incubação, os nanocarreadores indicam ação preventiva à adesão das células bacterianas em A549. Valores Médios de Intensidade de FITC, usado aqui como marcador das células bacterianas, medidos em Microscópio Confocal de Fluorescência. *K. pneumoniae* ATCC 1706 (1×10^5 UFC/mL) foi incubada após 90 minutos de interação entre células A549 (1×10^5 células/mL) e OM-NCs, (A) variando a concentração em dose-dependência, e (B) fixada a concentração de 1×10^9 part/mL para diferentes concentrações de bactéria. Não houve relevância estatística entre os dados. (C) Imagens de Microscopia Confocal comparando (C) os testes de dose-dependência de OM-NCs e (D) os resultados obtidos do tratamento com OM-NCs para uma concentração de 2×10^5 UFC/mL de *K. pneumoniae*. Fonte: pela autora.....64

Figura 18. O tratamento das células A549 com OM-NC em Regime Competitivo tem efeitos apesar do aumento da concentração bacteriana. Valores Médios de Intensidade de FITC, usado aqui como marcador das células bacterianas, medidos em Microscópio Confocal de Fluorescência após incubação por 90 minutos de células A549 (1×10^5 células/mL) com *K. pneumoniae* ATCC 1706 (1×10^5 UFC/mL) e OM-NCs ao mesmo tempo, (A) variando a concentração em dose-dependência, e (B) fixada a concentração de 1×10^9 part/mL para diferentes concentrações de bactéria. Não houve relevância estatística entre os dados. Dados representados pela média. (C) Imagens de Microscopia Confocal comparando (C) os testes de dose-dependência de OM-NCs e (D) os resultados obtidos do tratamento com OM-NCs para uma concentração de 2×10^5 UFC/mL de *K. pneumoniae*. Fonte: pela autora.....66

Figura 19. Os nanocarreadores não apresentaram efeito de destacamento na adesão bacteriana no intervalo de 15 a 90 minutos. Valores Médios de Intensidade de FITC, usado aqui como marcador das células bacterianas, medidos em Microscópio Confocal de Fluorescência. Após interação das células A549 (1×10^5 células/mL) e *K. pneumoniae* ATCC 1706 (1×10^5 UFC/mL) por 90 minutos, as OM-NCs (1×10^9 part/mL) foram incubadas por 15, 30, 60 e 90 minutos e não houve significância estatística na diminuição dos valores de fluorescência da bactéria. Fonte: pela autora.....68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Divisão de grupos submetidos a diferentes condições de cultivo para isolamento de OMVs e respectivas caracterizações.....28
- Tabela 2. Duas linhagens diferentes de *K. pneumoniae* produziram OMVs com características semelhantes. Diâmetro hidrodinâmico (nm), dispersão e carga superficial das OMVs medidos por DLS obtidas pelo cultivo de ambas as linhagens de *K. pneumoniae* em meio BHI, por 24 horas a 37°C (n=3, triplicata biológica) (Dados representados por média \pm erro padrão).....34
- Tabela 3. Tamanho e distribuição medidas por DLS, potencial Zeta, eficiência de encapsulamento (EE%) e concentração final da curcumina no polímero (n=3, triplicata biológica).....48
- Tabela 4. Concentração em partículas/mL, tamanho médio e moda, medidos por NTA; diâmetro hidrodinâmico, polidispersividade e Potencial Zeta, medidos em Zetasizer, dos nanocarreadores funcionalizados a partir de diferentes proporções de nanopartículas de PLGA e OMV (n=3, triplicata biológica).....49

SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	IX
INTRODUÇÃO.....	12
Revisão bibliográfica.....	13
I. Pneumonia bacteriana.....	13
II. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
III. Vesículas bacterianas de membrana externa (OMV).....	16
a) Biogênese.....	16
b) Funções.....	18
c) Aplicações.....	19
IV. Nanopartículas de PLGA.....	20
V. Revestimento com membranas biológicas e vesículas extracelulares.....	21
VI. Adesão bacteriana.....	23
VII. Imunomodulação de OMVs.....	24
1. CAPÍTULO 1 – OTIMIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE OMVs.....	26
1.1. Introdução.....	26
1.2. Objetivos e metas.....	27
1.3. Metodologia.....	27
1.3.1. Linhagens e cultivo bacteriano.....	27
1.3.2. Isolamento de OMVs.....	28
1.3.3. Caracterização das OMVs.....	29
1.4. Resultados e discussão.....	30
1.4.1. Otimização dos processos de isolamento das OMVs.....	30
1.4.2. Comparação entre linhagens de <i>K. pneumoniae</i>	31
1.4.3. Análise em diferentes fases de crescimento bacteriano.....	34
1.4.4. Comparação entre diferentes tempos de cultivo.....	36
1.4.5. Comparação entre meios de cultura.....	37
1.4.6. Comparação entre cultivos com diferentes disponibilidades de oxigênio.....	39

1.5. Conclusão.....	40
2. CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM REVESTIMENTO DE OMVS.....	42
2.1. Introdução.....	42
2.2. Objetivos e metas.....	43
2.3. Metodologia.....	44
2.3.1. Síntese de nanopartículas de PLGA (PLGA-NPs).....	44
2.3.2. Síntese e caracterização de OM-NCs.....	45
2.3.3. Caracterização das OM-NCs.....	45
2.4. Resultados e discussão.....	46
2.4.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de PLGA (PLGA-NPs).....	46
2.4.2. Síntese e caracterização de nanopartículas revestidas com OMV (OM-NCs).....	49
2.5. Conclusão.....	51
3. CAPÍTULO 3 – APLICAÇÃO DE NANOCARREADORES DE OMV NA ADESÃO BACTERIANA E MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE.....	53
3.1. Introdução.....	53
3.2. Objetivos e metas.....	54
3.3. Metodologia.....	55
3.3.1. Cultura de células.....	55
3.3.2. Linhagens bacterianas.....	55
3.3.3. Atividade Antimicrobiana – Mínima Concentração Inibitória (MIC).....	55
3.3.4. Internalização em células hospedeiras.....	56
3.3.5. Estudo da inibição da adesão bacteriana nas células pulmonares.....	56
3.4. Resultados e discussão.....	58
3.4.1. Atividade Antimicrobiana – Mínima Concentração Inibitória.....	58
3.4.2. Internalização em células hospedeiras e bacterianas.....	59
3.4.3. Estudo da inibição da adesão bacteriana nas células pulmonares.....	63
3.5. Conclusão.....	70
CONCLUSÕES GERAIS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças à saúde global, colocando em risco a eficácia da prevenção e do tratamento de diversas infecções microbianas. Considerando esse cenário mundial, torna-se urgente a busca por alternativas viáveis para a diminuição do número de infecções ocasionadas por microrganismos multirresistentes. Nos últimos anos, aumentaram-se os esforços na busca por compostos, principalmente naturais, que possuam propriedades semelhantes de ação anti-inflamatória e antimicrobiana que substituam a necessidade da antibioticoterapia. Nesse cenário, uma nova abordagem de interface do ponto de vista biológico e imunológico refere-se ao revestimento dessas partículas com membranas biológicas, que oferece a herança de propriedades físico-químicas e de funções biológicas inerentes ao sistema escolhido.

O uso de vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs) com essa finalidade tem sido foco de muitas pesquisas nos últimos anos, por se tratar de uma estrutura de fácil produção e manipulação, capaz de modular o sistema imune do hospedeiro e competir com o microrganismo patogênico pelos mesmos sítios de ligação nas células animais. Devido à sua natureza não replicativa, OMVs são consideradas seguras e eficazes mesmo em pequenas quantidades para várias aplicações biomédicas. Como as OMVs herdam diversos componentes imunogênicos presentes na membrana e no interior da bactéria parental, eles também possuem a capacidade imunoestimuladora para modular e ativar a resposta imune do hospedeiro e facilitar o tratamento de diversas doenças, incluindo as infecciosas.

Primeiramente neste trabalho, definiremos alguns termos e conceitos que serão utilizados nos capítulos a seguir. No **Capítulo 1**, foi realizada a otimização do processo de isolamento das OMVs, através de caracterizações estruturais, morfológicas e físico-químicas das vesículas isoladas a partir de suspensões bacterianas submetidas a diferentes condições de cultivo, comparando diferentes tempos, meios de cultura, cepas e disponibilidade de oxigênio. No **Capítulo 2**, foram sintetizadas nanopartículas poliméricas de poli (ácido-lático-co-glicólico) carregadas com Curcumina e Rhodamina B a partir da técnica de nanoprecipitação, para serem posteriormente funcionalizadas com o revestimento das OMVs isoladas previamente. Todas as sínteses e modificações foram caracterizadas em técnicas físico-químicas e de imagens de microscopia. Por fim, no

Capítulo 3, esses nanocarreadores foram aplicados em testes para comparar a capacidade de internalização antes e após a funcionalização em células alveolares, de macrófago e bacterianas; em testes anti-adesão com técnicas de microscopia a fim de investigar a competição dos nanocarreadores contra a bactéria parental em relação às células hospedeiras; e a capacidade de modular a expressão de marcadores imunológicos por células de macrófagos.

Portanto, considerando essas características, essa dissertação explora a síntese de nanopartículas poliméricas funcionalizadas com membranas bacterianas de OMVs. Essa estratégia é promissora para o tratamento de infecções bacterianas, uma vez que combina o potencial de nanomateriais com o direcionamento e a imunomodulação de revestimentos biológicos. Isso pode abrir caminho para o desenvolvimento de novas plataformas terapêuticas baseadas em nanomedicina para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas, especialmente infecções respiratórias inferiores como a pneumonia bacteriana.

Revisão Bibliográfica

I. Pneumonia bacteriana

As infecções respiratórias inferiores são a quarta maior causa de morte em todo o mundo e a principal causa de morte em países de baixa renda. Entre as mais frequentes estão bronquite aguda, bronquiolite, gripe e pneumonia. A pneumonia é a principal causa infecciosa de morte na Europa e nos Estados Unidos. É também a principal causa morte de crianças menores de 5 anos no mundo (WHO, 2022). No Brasil, a pneumonia é a causa número um de internação. Embora o número de internações tenha diminuído nas últimas décadas, a mortalidade intra-hospitalar aumentou, o que se explica principalmente pelo envelhecimento da população e a ocorrência de casos de pneumonia mais difíceis de tratar (LI et al., 2022).

A pneumonia bacteriana é uma infecção aguda no parênquima pulmonar, ocasionada por microrganismos residentes do trato respiratório superior, podendo ser precedida e facilitada por uma infecção respiratória viral. As bactérias podem ser encontradas em tecido pulmonar, secreção bronquial e outros fluidos estéreis (por exemplo, líquido pleural e sangue) e tem como sintomas: dificuldade na respiração, tosse,

febre e dor aguda no peito. Se não tratados, os quadros de pneumonia podem se agravar, como insuficiência respiratória, septicemia, sequelas pulmonares, como bronquiectasias, e até o óbito. Em agosto de 2021, foram contabilizadas mais de 25 mil internações e 3596 óbitos por pneumonia no Brasil, e em pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) atinge 50% de taxa de mortalidade (COFRÉ et al., 2019; LANKS; MUSANI; HSIA, 2019; MANDELL; NIEDERMAN, 2019).

As principais espécies potencialmente causadoras dessa patologia são *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. A pneumonia ocasionada por bactérias Gram-negativas pode ser adquirida através da aspiração de bactérias pelo trato respiratório superior ou trato gastrointestinal; da inalação de aerossóis; da disseminação hematogênica de locais distantes, como trato urinário ou gastrointestinal; ou de infecções nos alvéolos. Entre essas vias, a aspiração é uma causa comum de pneumonia adquirida em hospitais (do inglês, HAP) e pneumonia adquirida na comunidade (do inglês, CAP). Aproximadamente 45% dos adultos saudáveis aspiram bactérias orofaríngeas durante o sono, e a deglutição anormal de bactérias também pode ocorrer em pessoas com consciência deprimida e/ou pacientes ventilados mecanicamente (BASSETTI et al., 2022).

Algumas moléculas também são importantes para o desenvolvimento da doença, como adesinas, invasinas, vesículas da membrana externa, toxinas, cápsulas, fímbrias, flagelos, sistemas de aquisição de ferro e formação de biofilme. A adesão é auxiliada por estruturas na superfície bacteriana que promovem a adesão a células epiteliais; formam pili, cílios e cápsulas; e interagem com fatores do hospedeiro como proteínas de superfície, polissacarídeos, pH e formação de mucina nas vias respiratórias. A invasão bacteriana nos espaços entre células e alvéolos adjacentes, ativa o sistema imunológico, recrutando neutrófilos e macrófagos para o local da infecção, e leva à inflamação sistêmica (Figura 1), causando os principais sintomas respiratórios como febre, calafrios, fadiga, alterações na pressão arterial e até choque. A pneumonia grave pode causar hipóxia, levando à hiperventilação e morte (ASSEFA, 2022).

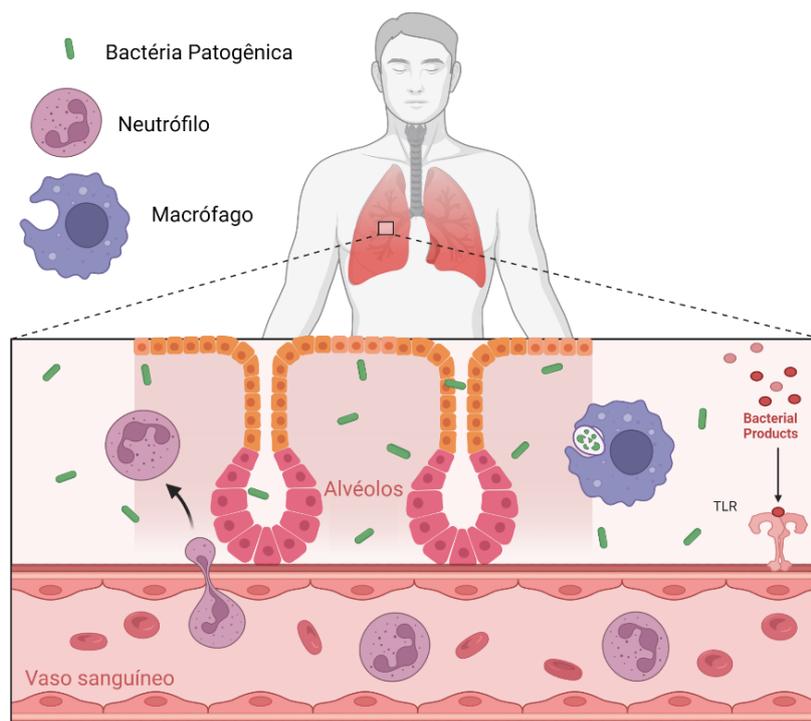


Figura 1. Microambiente da infecção pulmonar em pacientes com quadro de pneumonia bacteriana. Fonte: pela autora. Criado com BioRender.com

II. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia facultativa, imóvel, comumente presente no meio ambiente. Está associada à pneumonia adquirida na comunidade (CAP) e a diversas infecções hospitalares, sendo responsável por cerca de um terço de todas as infecções Gram-negativas em geral. Em humanos saudáveis, *K. pneumoniae* coloniza as superfícies mucosas da orofaringe, nasofaringe e trato gastrointestinal (STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA et al., 2022). Nas últimas décadas, foi motivo de preocupação no mundo todo, devido à sua hipervirulência e maior resistência aos fármacos disponíveis. Além das β -lactamases codificada no cromossomo conferirem uma resistência intrínseca, *K. pneumoniae* é capaz de antagonizar antimicrobianos por várias vias, por exemplo, hidrolisando enzimas, modificando lipopolissacarídeos (LPS), fazendo efluxo de proteínas, enzimas de replicação de genes, complexos de síntese de proteínas e enzimas de transcrição. De forma alarmante, cepas resistentes a carbapenêmicos (CR-KP) atingiu uma taxa de mais de 30% entre todas as cepas de *K. pneumoniae* e trouxe ainda mais desafios na prática médica (DAI; HU, 2022).

K. pneumoniae tem muitos genomas acessórios de plasmídeos e loci de genes cromossômicos. De acordo com o genoma acessório, as cepas de *K. pneumoniae* são divididas em três tipos: oportunistas, hipervirulentas e multirresistentes (MDR) (WYRES; LAM; HOLT, 2020). A *K. pneumoniae* clássica (cKP), naturalmente resistente à ampicilina, carbenicilina e ticarcilina devido à produção de uma penicilinase cromossômica (SHV-1), está se tornando cada vez mais multirresistente por meio da aquisição de fatores de resistência presentes no cromossomo ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons. A cKP multirresistente (MDR) é um dos principais fatores responsáveis por infecções nosocomiais, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário e da corrente sanguínea. MDRcKP que produzem β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases são responsáveis por altas taxas de mortalidade (40-50%), principalmente entre pacientes internados e imunocomprometidos. O acúmulo contínuo de genes resistentes a antibióticos no cKP resultou no surgimento de cepas extensivamente resistentes a medicamentos (XDR) e pandrug-resistentes (PDR), que protege o cKP contra todos os antimicrobianos disponíveis (LI et al., 2023; RUSSO; MARR, 2019). Portanto, uma maior compreensão dos mecanismos de virulência e resistência a medicamentos em *K. pneumoniae* são urgentemente necessários. Fatores de virulência conhecidos por elevar a patogênese incluem pili, cápsula, lipopolissacarídeos (LPS), aquisição de ferro, detecção de quorum e sistemas de secreção bacteriana, como vesículas de membrana externa (OMVs) consideradas um sistema de secreção bacteriana tipo 0 (WANG et al., 2020b).

III. Vesículas bacterianas de membrana externa (OMV)

a. Biogênese

As vesículas bacterianas da membrana externa (OMVs) são estruturas esféricas, não-replicativas, naturalmente produzidas a partir da membrana externa de espécies Gram-negativas, que herdam diversos componentes derivados da bactéria de origem, como enzimas, fatores de virulência, antígenos, material genético, entre outros (LI et al., 2020; WANG; GAO; WANG, 2019).

Para entender melhor os mecanismos propostos para a biogênese das OMVs, é importante conhecer a estrutura da membrana bacteriana. O envelope das bactérias Gram-negativas contém duas membranas – a membrana externa e a membrana citoplasmática – e uma camada de peptidoglicano (PG) como espaço periplasmático entre elas. A membrana citoplasmática é composta por uma bicamada fosfolipídica responsável pela

barreira osmótica, entrega de elétrons e enzimas e biossíntese de lipídios (NGUYEN et al., 2022). Da mesma forma, a membrana externa é composta por dois folhetos: o externo formado por lipopolissacarídeos (LPS), composto pela porção lipídica A, oligossacarídeos e antígeno-O; e o interior feito de fosfolipídios. A porção lipídica A é estabilizada por pontes de sais catiônicos bivalentes e serve como ancoragem lipídica de ácidos graxos (MITCHISON-FIELD; BELIN, 2023). Além disso, algumas interações químicas, conhecidas como *crosslinks*, ajudam o envelope a ser estável; consequentemente, sua ausência interfere na produção de OMVs. Alguns *crosslinks* importantes são a ligação não covalente entre o PG e a proteína A da membrana externa (OmpA); a interação também não covalente entre o PG e o complexo lipoproteína associada ao peptidoglicano (Tol-Pal) que atravessa as duas membranas e o espaço periplasmático; e a ligação covalente de lipoproteínas na membrana externa e PG (Figura 2) (KIM et al., 2023a).

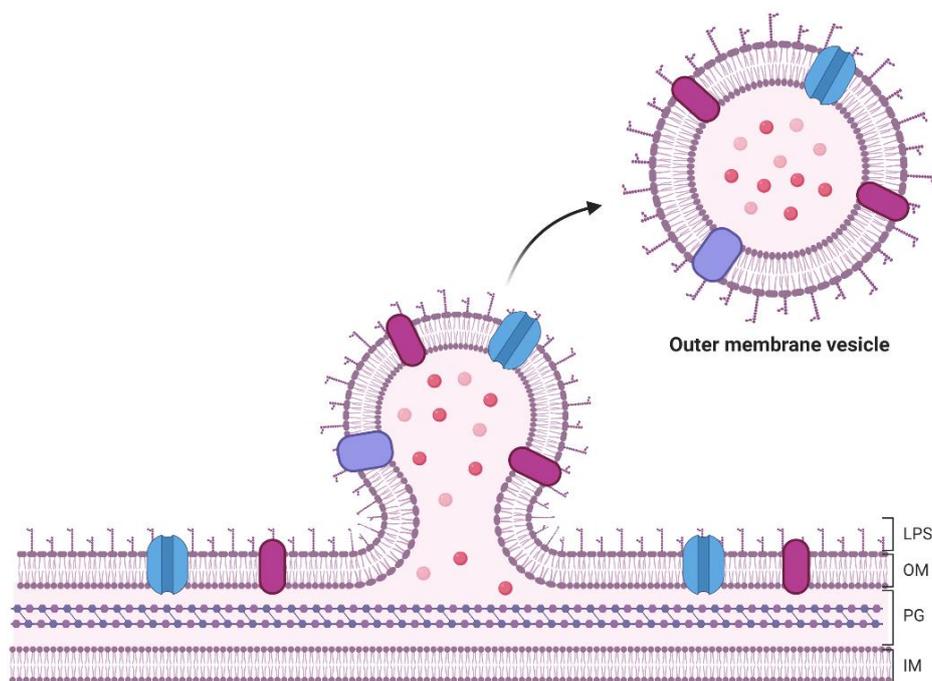


Figura 2. Estrutura da membrana bacteriana e biogênese das OMVs. Podem ser observadas as camadas bacterianas mais importantes, como lipopolissacarídeo (LPS), membrana externa (OM), camada de peptidoglicano (PG) e membrana interna (IM). As OMVs brotam a partir da membrana externa, preservando algumas características estruturais, ao mesmo tempo que variam a carga interna. Fonte: pela autora. Criado com BioRender.com

Apesar da crescente relevância biológica das OMVs, sua biogênese ainda não é completamente conhecida. As OMVs podem ser formadas por duas vias principais em

bactérias Gram-negativas, seja por formação de bolhas na membrana externa ou por lise celular explosiva e auto-enrolamento de fragmentos de membrana quebrados. A lise celular explosiva é desencadeada por estresse genotóxico, isto é, quando genes são danificados por condições físicas e/ou químicas, ativando a expressão de endolisinas que degradam a camada de peptidoglicano bacteriano. As diferentes rotas de biogênese dão origem a tipos particulares de OMV que possuem estruturas e conteúdos distintos, que acabam por determinar suas funções (TOYOFUKU et al., 2023). Por outro lado, para as OMVs que brotam da membrana externa, a biogênese pode ocorrer devido a alterações na composição do LPS; dissociação da membrana externa e interna em zonas específicas; e acúmulo de proteínas mal dobradas no periplasma. A consequência é uma expansão assimétrica do folheto externo em relação ao folheto interno, contribuindo para a curvatura da membrana e consequente pinçamento (LI; SCHERTZER; YONG, 2019b; MARCHANT et al., 2021).

Por fim, o modelo mais estudado até agora, denominado “modelo de dupla camada”, é baseado no desempenho de uma pequena molécula autoproduzida encontrada em *Pseudomonas aeruginosa*, o sinal de quinolona de *Pseudomonas* (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona ; PQS). Além de desempenhar outras funções, o PQS é uma das múltiplas moléculas de sinalização responsáveis por uma comunicação e harmonização mais rápidas entre as células do microbioma, fenômeno conhecido como quorum-sensing (LIN et al., 2018) . O mecanismo proposto mostra que a interação fortemente hidrofóbica de PQS com a porção lipídica A da camada LPS da membrana externa enfraquece sua afinidade com a camada fosfolipídica ao sequestrar cátions divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+} , causando uma repulsão aniônica entre moléculas vizinhas de LPS. Essa repulsão gera uma expansão assimétrica do folheto externo em relação ao folheto interno, contribuindo para a curvatura da membrana e posterior pinçamento (COOKE et al., 2020; LI; SCHERTZER; YONG, 2019a).

b. Funções

Como dito anteriormente, a biogênese das OMVs pode ser aumentada em situações de estresse – alta temperatura, presença de contaminantes como antibióticos e detergentes, estresse oxidativo – uma vez que levam à lise celular explosiva e à ativação de fatores de transcrição específicos, incluindo dobramento do envelope celular, fatores de virulência e fatores de biogênese (JAN, 2017; QING et al., 2019). Para cada uma

dessas situações, diferentes genes são expressos para produzir moléculas importantes que irão lidar com o ambiente estressante.

Antibióticos e os peptídeos antimicrobianos também ameaçam a sobrevivência das bactérias, pois geralmente atingem a parede celular, a membrana celular ou interferem nos peptídeos essenciais. Além de mostrar a capacidade de absorver todas essas substâncias, as OMVs carregam enzimas importantes, como carbapenemases, β -lactamases e proteases que podem ser úteis contra esse tipo de perigo para as bactérias produtoras e outras espécies que são co-cultivadas (CARUANA; WALPER, 2020).

As OMVs desempenham outras funções importantes para a sobrevivência da bactéria parental. Por exemplo, elas são capazes de empacotar enzimas e toxinas degradativas e secretar para fora da célula; servem como veículos de entrega de genes de resistência e fatores de virulência para bactérias do mesmo gênero ou outro. Esses elementos também podem ser entregues ao hospedeiro por OMVs de espécies patogênicas, permitindo o estabelecimento da patologia por meio de resistência antimicrobiana, aumento da virulência, modulação da resposta imune e invasão celular, aderência e dano. Também são importantes na formação de biofilme e consequente aquisição de nutrientes e quorum sensing entre as células. Além disso, as OMVs também possuem mecanismos para competir e causar danos a bactérias de espécies diferentes da bactéria parental (KIM et al., 2023; TOYOFUKU et al., 2023).

c. Aplicações

Por essas e outras funções, as OMVs têm se mostrado eficazes e seguras na otimização de tratamentos em geral, como a terapia antimicrobiana (STEVENSON et al., 2018; WU et al., 2020), antitumoral (WANG et al., 2020a; ZHANG et al., 2019a), transporte de fármacos (KUERBAN et al., 2020) e a produção de vacinas (MANCINI et al., 2020; SHEHATA et al., 2019; WANG; GAO; WANG, 2019; WANG et al., 2020c).

A eficiência da utilização de OMVs em vacinas se dá através das suas propriedades imunogênicas e auto-adjuvantes, podendo ativar respostas imunes específicas, tanto de forma homóloga (promovendo proteção contra a própria bactéria produtora da vesícula), quanto heteróloga (onde proteínas antigênicas são produzidas por uma vesícula geneticamente modificada). Por serem de fácil manipulação genética, podem ser produzidas OMVs recombinantes que expressam as moléculas adequadas para induzir uma resposta imune humoral ou celular, ou ativar uma cascata de inflamação

específica (BYVALOV et al., 2020; SCHETTERS et al., 2019). Além disso, por herdarem características da bactéria parental, algumas substâncias microbianas presentes nas OMVs (como DNA, RNA, lipoproteínas, LPS e peptidoglicanos) servem como padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, PAMPs), que ativam o sistema imune ao se ligarem a receptores de reconhecimento padrão (do inglês, PRR), expressas em fagócitos e outros tipos celulares. Os PRRs são essenciais em gerar uma resposta devido a interação com microrganismos, iniciando a cascata de sinalização de mediadores inflamatórios, favorecendo o controle da inflamação através de citocinas e quimiocinas, a morte celular e a proteção do hospedeiro (GIORDANO; CIAN; DALEBROUX, 2020).

Para estudar essas estruturas, é necessário separar as OMVs das bactérias parentais. Existem diferentes métodos de isolamento que podem ser escolhidos dependendo dos requisitos, enquanto a caracterização envolve técnicas analíticas como microscopia eletrônica, estudos de imuno co-localização, espectrometria de massa (MS) e outros métodos proteômicos (WINDLE, 2021). Além disso, uma vez que situações de estresse podem levar ao aumento da formação de OMVs, as condições de cultivo irão alterar a expressão de proteínas específicas e modular as propriedades físicas das células bacterianas e a biogênese e carga da OMV, devido a diferenças na disponibilidade de nutrientes, densidade populacional e concentração de metabólitos secundários (QING et al., 2019).

IV. Nanopartículas de PLGA

A nanotecnologia desempenha atualmente um papel fundamental nos avanços científicos e tecnológicos da medicina e da indústria farmacêutica, e refere-se à manipulação de materiais controlando seu tamanho e forma. As nanopartículas (NPs) são materiais particulados em escala nanométrica que permitem modificar tanto as propriedades físicas e químicas dos materiais, quanto sua morfologia e tamanho. Quanto menores e mais esféricos forem os NPs, maior será a relação superfície-volume, o que ajuda a aumentar as atividades químicas e biológicas dos NPs (DIEP et al., 2022; GOWD et al., 2022).

As NPs têm sido utilizadas para diferentes aplicações, como na administração de medicamentos, terapia fotodinâmica, imagens biológicas, aplicações em biossensores e até mesmo como alternativa para reduzir a resistência antimicrobiana (YETISGIN et al., 2020). Essas aplicações incluem o uso de NPs como componentes antimicrobianos em

materiais avançados para dispositivos médicos e em superfícies que podem ser encontradas dentro ou fora do corpo ou pode ser projetada para terapias *in vivo*. Os principais mecanismos de ação das nanopartículas nestes casos são: i) interação com a parede e membrana celular; ii) produção de radicais livres; iii) penetração na membrana celular; iv) inibição de síntese proteica e dano ao material genético; v) dano às vias metabólicas bacterianas; e vi) inibição da formação de biofilme (BALDERRAMA-GONZÁLEZ et al., 2021).

As propriedades das nanopartículas poliméricas, resultantes do seu tamanho em escala nanométrica, chamam a atenção para a resolução de limitações que algumas terapias enfrentam. Sua aplicação como nanocarreadores, por exemplo, aumentam a estabilidade, a permeabilidade, a biodisponibilidade e o efeito terapêutico da molécula que transportam; oferecem controle da liberação de um fármaco e da funcionalidade da sua superfície; e protegem seu interior de degradação enzimática e mudanças no microambiente (ALLAHYARI, 2022; ZIENLINSKA et al., 2020). O poli (ácido-lático-co-ácido glicólico) (PLGA) é um copolímero aprovado pela Agência de Administração de Drogas e Alimentos (do inglês, FDA), muito utilizado como nanopartícula polimérica, oferecendo um material biodegradável, com toxicidade sistêmica mínima e alta biodisponibilidade. Pode ser sintetizado em diferentes proporções de ácido lático e ácido glicólico, proporcionando mudanças em propriedades como solubilidade, taxa de degradação e resistência mecânica (SHEN et al., 2020). Portanto, modificações na sua estrutura interna e superficial provaram ser úteis na modulação do sistema imune e na entrega de fármacos em termos de direcionamento e liberação. No entanto, sua aplicação é limitada porque as nanopartículas de PLGA NPs administradas por via intravenosa são facilmente opsonizadas e eliminados pelo sistema endotelial reticular (GUO et al., 2023; ZHANG et al., 2022).

V. Revestimento com membranas biológicas e vesículas extracelulares

O sistema de entrega de NPs sintéticas atualmente explorado ainda apresenta muitas deficiências, o que limita sua aplicação clínica. Uma vez que as NPs entram no corpo humano, elas encontram um ambiente altamente complexo, naturalmente capaz de identificar e eliminar objetos estranhos (LIU; HUANG, 2022). Para contornar este problema, foram iniciados estudos de revestimento de nanopartículas, sob a hipótese de que o uso de membranas celulares para funcionalizar NPs poderia acrescentar propriedades desejáveis, como interação com substratos biológicos, ou biointerface,

permitindo que naveguem efetivamente em ambientes biológicos complexos, evitando a depuração imunológica e acumulando-se especificamente em locais de doenças (DESAI et al., 2023). As nanopartículas deste tipo são geralmente fabricadas pelo revestimento de nanomateriais sintéticos com uma camada de membranas celulares, o que resulta em uma nanoestrutura núcleo-casca com propriedades herdadas da célula parental. Dependendo da doença alvo, diferentes células podem ser usadas como células cancerígenas, células-tronco, células imunes, células vermelhas do sangue, plaquetas e membranas microbianas (ZHANG; HUANG, 2022).

A técnica de fabricação de nanopartículas de células híbridas consiste em um nanomaterial sintético e uma camada externa de membrana celular. Esse design híbrido permite que os NPs explorem muitas das vantagens de cada parte constituinte. Para fabricar esse tipo de nanopartícula, o material da membrana celular é obtido principalmente a partir de coleta e processamento, como hemácias, plaquetas e células imunes, ou cultivadas em laboratório, no caso de linhagens celulares ou cepas bacterianas. Em seguida, o material da membrana é derivado das células por meio de tratamento hipotônico, ciclos de congelamento-descongelamento ou separação da membrana plasmática.

Vesículas extracelulares também podem ser usadas como fonte de material de revestimento (FANG; GAO; ZHANG, 2023a), que podem ser coletadas diretamente do meio de cultura bacteriana por ultrafiltração, o que facilita a extração e purificação quando comparadas às membranas de células eucarióticas. Após a purificação, a membrana celular é revestida na superfície das nanopartículas por meio de extrusão ou ultrassom. Paralelamente, as nanopartículas revestidas podem ser isoladas por ultracentrifugação, enquanto as propriedades intrínsecas de certos nanomateriais também podem ser aproveitadas para fins de purificação. Métodos como microscopia eletrônica de transmissão, Western blotting, espectrometria de massa, ensaios de estabilidade são usados para avaliar a complexidade e integridade do revestimento da membrana, os quais devem ser otimizados para que as NPs funcionem como pretendido (LIU et al., 2022). Devido a uma variedade de PAMPs e antígenos derivados de bactérias, as OMVs têm sido estudadas para o desenvolvimento de vacinas bacterianas, uma vez que produzem fortes respostas imunológicas celulares e humorais contra suas bactérias progenitoras. Os vários PAMPs permitem que as membranas bacterianas sejam usadas como um adjuvante, o que pode aumentar e regular respostas imunes específicas a antígenos expressos em

membranas de bactérias ou misturado com membranas de bactérias (ZENG et al., 2022). Uma vantagem de usar a abordagem de revestimento de membrana é que as partículas podem manter seu formato nanométrico, determinado pelo seu substrato sintético. Tamanhos finais de nanopartículas abaixo de 50 nm são ideais para o transporte linfático e podem ajudar a promover subsequente imunidade em processamento (FANG et al., 2018).

VI. Adesão bacteriana

A colonização é um passo crucial para a patogenicidade bacteriana, pois é necessário que o patógeno se prenda às células e tecidos do hospedeiro para iniciar a infecção. A colonização facilita a liberação de toxinas e fatores de virulência para a célula hospedeira e ajuda a bactéria a resistir à imunidade do hospedeiro, que conta com diversos mecanismos que inibem a ligação bacteriana (HOLMES et al., 2021). A complexidade das ferramentas bacterianas usadas para adesão e invasão celular varia de proteínas monoméricas simples a macromoléculas multiméricas intrincadas que executam funções altamente sofisticadas, além dos diversos mecanismos envolvidos, incluindo interações hidrofóbicas, interações proteína-proteína e ação de lectinas de superfície. A adesão bacteriana permite a obtenção de nutrientes, a entrega de toxinas e enzimas à célula hospedeira, e confere tropismo tecidual, direcionando a interação entre o hospedeiro e o patógeno. Isso garante que as bactérias aproveitem o ambiente mais adequado às suas necessidades fisiológicas e metabólicas e a utilização do ambiente mais desejável para crescimento e colonização, internalização ou formação de biofilme. No entanto, o enfraquecimento da adesão bacteriana pode facilitar a eliminação do patógeno pelo sistema imunológico do hospedeiro (ASADI et al., 2019).

Moléculas de adesão são moléculas de superfície celular, que se ligam a receptores ou com macromoléculas solúveis presentes na membrana extracelular do hospedeiro para promover a adesão celular e estão envolvidas na patogênese do hospedeiro. Diversas moléculas microbianas, que estão envolvidas na adesão, também promovem a internalização e facilitam a colonização bacteriana, como adesinas, invasinas, vesículas da membrana externa, toxinas, cápsulas, fímbrias e flagelos. A interação dessas adesões com os receptores da superfície da célula hospedeira não apenas ajuda na ligação e invasão, mas também exibe uma cascata de sinalização pró e/ou anti-inflamatória estimulando uma resposta imune. Além disso, as moléculas de adesão não apenas desencadeiam a resposta imune, mas também interferem na sinalização do hospedeiro e

modulam seu mecanismo intracelular (BISHT; MEENA, 2019). Além dos pili e das fímbrias, existe uma infinidade de diferentes adesinas bacterianas que reconhecem muitos elementos diferentes das superfícies das células hospedeiras, incluindo componentes da matriz extracelular, como colágeno, lamininas, elastina, proteoglicanos e hialuronano. Glicoproteínas adesivas como a vitronectina, o fibrinogênio e especialmente a fibronectina – que podem estar presentes como moléculas secretadas ou associadas à membrana plasmática – também são reconhecidas por muitas espécies diferentes de patógenos bacterianos. Receptores integrais de adesão à membrana do hospedeiro, como integrinas, caderinas, selectinas são receptores de muitos patógenos para adesão e, algumas vezes, para entrada na célula (JOSSE; LAURENT; DIOT, 2017).

VII. Imunomodulação de OMVs

Como as OMVs são estruturas que auxiliam no desenvolvimento da patogênese e sobrevivência da bactéria parental, ela é capaz de interagir com diversas células do sistema imunológico do hospedeiro. As células epiteliais constituem a primeira barreira do sistema imunológico contra microrganismos (KAPARAKIS-LIASKOS; KUFER, 2020; TURNER et al., 2018). Essas células, assim como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs), expressam Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) que interagem diretamente com estruturas microbianas como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano, Lipídeo A, DNA, RNA e toxinas. Essas estruturas são chamadas de Padrões Moleculares Associados a Microorganismos (PAMPs), que podem ser encontrados dentro ou na superfície de OMVs por meio da herança da carga proteica da bactéria parental. Existem dois tipos principais de PRRs capazes de detectar microrganismos: os receptores Toll-like (do inglês, *TLR*) são proteínas transmembranares capazes de reconhecer PAMPs de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; e os receptores do tipo NOD estão localizados no citoplasma das células hospedeiras e se ligam principalmente a dipeptídeos presentes na camada de PG bacteriana. Com essa conexão, inicia-se o processo de ativação e sinalização do sistema imune inato, por meio da liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias e moléculas antimicrobianas (CAÑAS et al., 2018; MOLINA-TIJERAS; GÁLVEZ; RODRÍGUEZ-CABEZAS, 2019).

Por apresentarem a habilidade de interagir com o sistema imune, existem estudos que demonstram a ação das OMVs sob diversas células imunológicas, principalmente os

macrófagos (PATHIRANA; KAPARAKIS-LIASKOS, 2016). Este fagócito, em seu estado polarizado, é um importante determinante da resposta inata à infecção bacteriana intracelular. Os macrófagos com fenótipo de polarização M1 (ativação clássica) são pró-inflamatórios e promovem uma forte atividade contra patógenos intracelulares, com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86, e fazem o recrutamento de outras células imunes, incluindo neutrófilos e células Th1 (CHO et al., 2020; NANDAKUMAR et al., 2017). Os macrófagos M1 liberam um grande número de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23. Além disso, macrófagos M1 expressam altamente CD40, CD64, CD68, CD80, CD86. Em tecidos normais, a proporção de macrófagos M1 é precisamente regulada e aumenta durante a inflamação. No estágio inicial da resposta inflamatória, macrófagos M1 englobam patógenos estranhos e removem bactérias e restos celulares. No entanto, a secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode piorar a reação inflamatória, resultando em dano tecidual e bloqueio da cicatrização de feridas.

Os macrófagos com fenótipo M2 (ativação alternativa) têm um papel regulador imunológico que funciona para limitar os danos ao tecido infectado. Produzem citocinas anti-inflamatórias e promovem a fibrose e a cicatrização de feridas. As células M2 aumentam a produção de arginase (Arg-1) e também expressam o receptor de manose (CD206), que sinaliza a produção de quimiocinas que recrutam linfócitos Th2 e células T reguladoras (Treg). O fenótipo M2 também é subdividido em grupos M2a a M2d (THIRIOT et al., 2020). Além disso, é possível alterar os estados de polarização, onde macrófagos ativados de forma clássica e alternativa são observados no mesmo microambiente (MOHAMMADI et al., 2019; THIRIOT et al., 2020). Devido a essa propriedade de plasticidade, alguns estudos revelaram a capacidade da curcumina em suprimir a inflamação mudando o fenótipo de polarização dos macrófagos de M1 para M2 (CHEN et al., 2014; GAO et al., 2015). O receptor Toll-like 4 (TLR4) e sua via de sinalização também são inibidos pela curcumina por meio da regulação da polarização de macrófagos (ZHOU et al., 2015). Portanto, o efeito imunomodulatório das OMVs podem se mostrar ainda mais efetivos contra infecções bacterianas se unidos aos efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos da curcumina.

1. CAPÍTULO 1 – OTIMIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE OMVs

1.1. Introdução

As vesículas bacterianas de membrana externa (do inglês, OMVs) são pequenas nanopartículas lipídicas esféricas, de 10 a 300 nm, produzidas naturalmente por bactérias Gram-negativas. Elas se assemelham à membrana externa da cepa bacteriana da qual são derivadas e são compostas pelo lúmen vesicular de lipopolissacarídeos, peptidoglicano, fosfolipídios, material genético (DNA e RNA) e componentes proteicos citoplasmáticos e periplasmáticos. OMVs de bactérias patogênicas podem se fundir com outras membranas bacterianas, fornecendo fatores de virulência, como toxinas e plasmídeos de resistência a antibióticos (KIM et al., 2023b; LIEBERMAN, 2022). OMVs podem ser liberadas por organismos patogênicos ou não patogênicos, embora ela não seja capaz de causar doença por si só, pois não é replicativa.

A biogênese e a composição da OMV são influenciadas pela temperatura, ambiente de crescimento, detecção de *quórum sensing* e fase de crescimento da bactéria. As OMVs podem modular a imunidade do hospedeiro devido às proteínas imunogênicas, com potencial de iniciar reações inflamatórias em resposta a certas infecções, como infecções do trato respiratório superior, do trato urinário, gastrointestinal e sangue. Essas vesículas desempenham um papel fundamental nas interações bactéria-ambiente, bactéria-bactéria e bactéria-hospedeiro. As OMVs são reconhecidas por seu papel na aquisição de nutrientes, resposta ao estresse, formação de biofilme e liberação de toxinas, transporte de fatores de virulência, fatores de adesão e também na evasão do sistema de defesa do hospedeiro (HAN et al., 2022).

Apesar do crescente interesse e aplicação de OMVs na prevenção e tratamento de doenças importantes, existem poucas informações disponíveis sobre a otimização dos processos de isolamento OMV, explorando a influência das condições de cultivo no rendimento, estrutura e proteômica de OMVs, principalmente de cepas virulentas e resistentes de *K. pneumoniae*, uma vez que ela representa um dos patógenos mais preocupantes envolvidos em infecções nosocomiais, desempenhando um papel crucial na interação micro-organismo-hospedeiro através da modulação da transcrição genética de miRNAs e influenciando a resposta inflamatória (DELL'ANNUNZIATA et al., 2021). Essas características certamente beneficiariam estudos baseados em conceitos de nanomedicina, envolvendo vesículas extracelulares bacterianas.

1.2. Objetivos e metas

Neste capítulo descrevemos a otimização do processo de extração das OMVs e verificação da sua integridade e estrutura através de técnicas de caracterização.

- a. Cultivar células bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* de acordo com os protocolos estabelecidos pela ATCC®;
- b. Extrair OMVs da membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* a partir de técnicas de centrifugação, filtração e ultracentrifugação;
- c. Comparar a quantidade e características das OMVs extraídas a partir de diferentes condições de cultivo bacteriana;
- d. Caracterizar as vesículas por técnicas de microscopia, espalhamento de luz dinâmico (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), Potencial Zeta e análises de quantificação proteica.

1.3. Metodologia

1.3.1. Linhagens e cultivo bacteriano

A etapa de cultivo das bactérias utilizadas neste projeto foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), coordenado pela Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, na Universidade Federal de São Carlos e também no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Ótica e Fotônica (CEPOF), do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. Todas as manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar.

O microrganismo escolhido para a etapa de extração de OMVs foi a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 e A54970, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar – UNESP). Ambas as cepas foram pré-cultivadas em meio Brain-Heart Infusion (BHI) a 37°C com agitação a 150 rpm por 18-24 horas. Em seguida, ambas as linhagens foram submetidas a diferentes condições de cultivo descritas a seguir, e as OMVs produzidas foram isoladas e quantificadas. As condições de crescimento de diferentes grupos estão resumidas na Tabela 1. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Tabela 1 – Divisão de grupos submetidos a diferentes condições de cultivo para isolamento de OMVs e respectivas caracterizações.

Grupo	Meio de cultura	Tempo	Análise
1	BHI	24 horas	Linhagens diferentes de <i>K. pneumoniae</i>
2	BHI	Dependente da densidade óptica (OD)	Fases de crescimento diferentes
3	BHI	24, 48, 72 e 96 horas	Diferentes tempos de cultivo
4	BHI x MH x LB	24 horas	Diferentes meios de cultura
5	BHI	24 horas	Cultura em falcon de 15 mL e placa de 6 poços, sob agitação, estático ou em câmara de CO ₂

- Grupo 1: Cepas de bactérias foram cultivadas separadamente em meio Brain-Heart Infusion (BHI Broth, #M210 HiMedia) a 37°C, por 24 horas sob agitação (150 rpm);

- Grupo 2: As bactérias foram cultivadas por diferentes períodos de tempo, representando diferentes estágios de crescimento, utilizando como parâmetro medidas de densidade óptica (DO). Os valores 0,1, 0,5, 1,0 e 1,3 foram usados como correspondentes às fases lag, log, estacionaria e decaimento;

- Grupo 3: As bactérias foram cultivadas por diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas) em meio BHI a 37°C sob agitação (150 rpm);

- Grupo 4: As bactérias foram cultivadas em meios de cultura Mueller Hinton Broth (#M319, HiMedia), Brain-Heart Infusion Broth (#M210, HiMedia) e Luria Bertani Broth (#M1245, HiMedia) a 37°C por 24 horas sob agitação (150 rpm);

- Grupo 5: As bactérias foram cultivadas em diferentes condições de troca gasosa, alternando entre cultivo estático, agitado e em estufa de CO₂ em falcon de 15 mL ou placa de 6 poços.

1.3.2. Isolamento de OMVs

Após o cultivo nas condições determinadas, a bactéria foi removida por 2 centrifugações (3300 × g, 15 min, 4°C) e filtrada em membrana 0,22 μm, cujo sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação (100.000 × g, 2 h, 4°C) (Beckman Coulter Optima L-90k, rotor SW32) para recuperar as OMVs. Depois foi realizada uma lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) por ultracentrifugação, e as OMVs foram estocadas a -80°C.

1.3.3. Caracterização das OMVs

1.3.3.1. Dynamic Light Scattering (DLS) e Potencial Zeta

A distribuição de tamanho e potencial de carga de superfície de OMVs em PBS estéril foi determinado com DLS usando um Malvern Nano ZS Zetasizer (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). Amostras em triplicata de OMVs diluídas (1:20) em 1,0 mL de água foram inseridas em cubetas de dimensionamento descartáveis e de leitura de potencial zeta a 25 °C. O diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average) e o potencial de superfície (Potencial Zeta) das OMVs foram coletados e analisados com o software Zetasizer.

1.3.3.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Amostras isoladas de OMV foram analisadas usando o NanoSight NTA NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) para determinar a concentração e distribuição de nanopartículas. Um volume de teste de 1,5 mL diluída (1:10) foi injetado no NTA e analisado em triplicata de vídeo de 60 segundos. Entre as execuções, as amostras foram avançadas para introduzir alíquotas de amostras frescas para quantificação. A sensibilidade da câmera e o limiar de detecção foram otimizados por vídeo e a temperatura foi ajustada para 25 °C. O nível da câmera variou entre 10 e 13 e a média de partículas por quadro variou entre 80 e 100. As leituras foram analisadas usando o software NTA versão 3.3. A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism Software Versão 8.0 (GraphPadSoftwareInc.).

1.3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica do OMVs foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (FEG-SEM). Os substratos de silício (Sigma-Aldrich) foram limpos com acetona, isopropanol, etanol e água em um banho de ultrassom por 10 minutos cada. Após a limpeza, 10 µL das amostras foram colocadas nos substratos e secas a vácuo em dessecador, onde permaneceram durante a noite. As imagens foram então obtidas usando um Zeiss Sigma VP FEG-SEM a 3 kV no modo de alto vácuo.

1.3.3.4. Quantificação de proteínas

A concentração de proteína foi medida por um ensaio de ácido bicinoníico (BCA) (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram medidas em triplicata e

comparadas com uma curva padrão obtida usando diluições seriadas de albumina sérica bovina (BSA) em leitura de absorbância a 562 nm.

A composição proteica das OMVs foi investigada por SDS-Page. 15 μ L de OMVs isoladas foram diluídos em 5 μ L de tampão de amostra. Bactérias lisadas foram usadas como amostra de controle. A lise celular de 500 μ L de cultura bacteriana ($OD_{600} = 0,5$) foi realizada por centrifugação ($3,3 \times g$, 5 min) e adição de 50 μ L de tampão de lise (150 mM NaCl, 1% Triton 100-X e 50 mM Tris-HCl pH = 8,0). As suspensões foram aquecidas a 50°C por 5 minutos e 15 μ L foram misturados com 3 μ L de tampão de amostra. Todas as amostras foram fervidas a 95 °C por 5 minutos antes de serem inseridas em géis SDS a 15%. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente (RT) com voltagem constante de 100 V. Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Blue (BlueCode™ Thermo Fisher Scientific) com agitação suave durante a noite. Os géis foram então lavados três vezes em solução de etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) em água destilada por 30 minutos. As imagens foram obtidas com Gel Doc EZ Imaging System (Bio-Rad™) e processadas com o software Image Lab™.

1.4. Resultados e discussão

1.4.1. Otimização dos processos de isolamento das OMVs

Como consta na literatura, a biogênese das OMVs pode ser estimulada e aumentada por situações de estresse - alta temperatura, presença de contaminantes como antibióticos e detergentes, estresse oxidativo - pois levam à ativação de fatores de transcrição específicos, incluindo proteínas responsáveis pelo dobramento do envelope celular, fatores de virulência e fatores de biogênese (BHAR; EDELMANN; JONES, 2021; KLIMENTOVA et al., 2019a; ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2021). Dessa forma, neste estudo investigamos a interferência de diferentes condições do cultivo bacteriano na produção e no perfil proteico das respectivas OMVs (Figura 3).

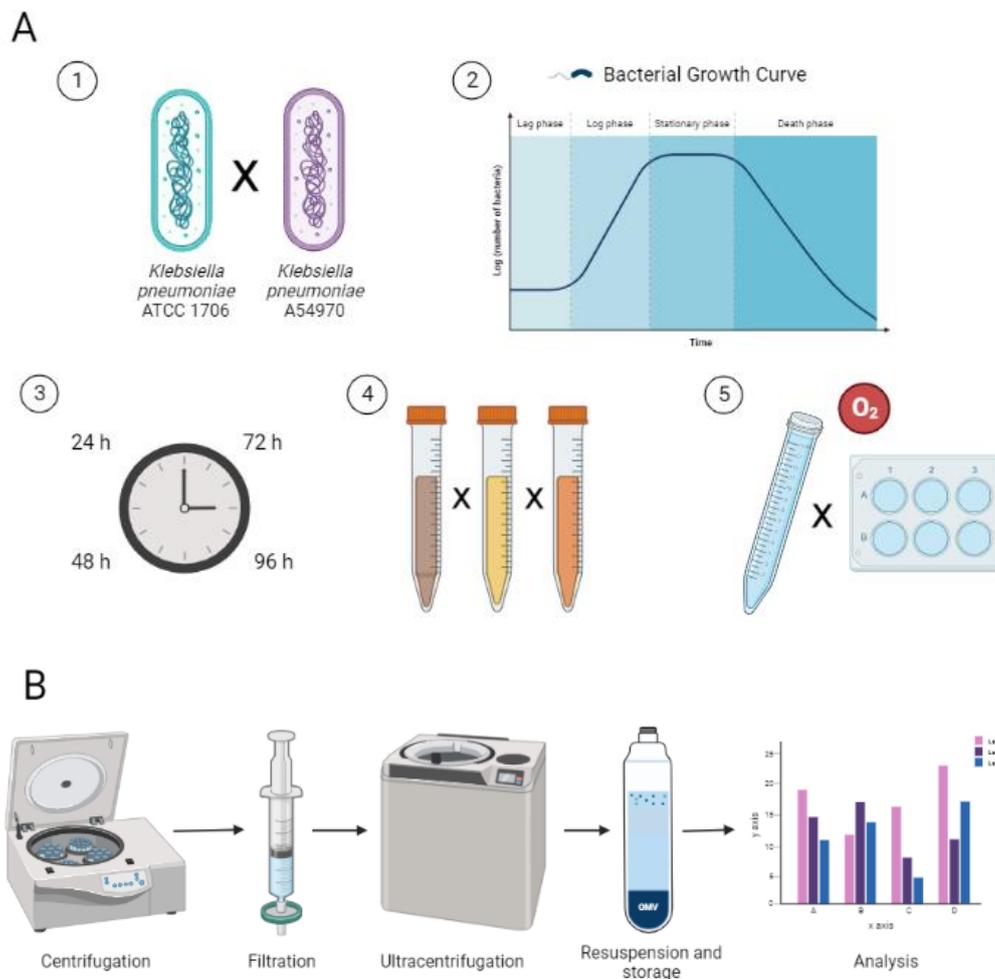


Figura 3. Representação esquemática mostrando as (A) diferentes condições de cultivo testadas para verificar cada influência na biogênese da OMV, onde 1) é a comparação entre duas cepas diferentes de *Klebsiella pneumoniae*; 2) é o isolamento de OMV em diferentes estágios do crescimento bacteriano; 3) comparação entre diferentes épocas da cultura; 4) comparação de três meios de cultura diferentes; e 5) diferentes condições de troca gasosa. (B) Processo de isolamento para obtenção dos resultados discutidos neste estudo, iniciado após as condições de cultivo apresentadas acima. Fonte: pela autora. Criado com BioRender.com

1.4.2. Comparação entre linhagens de *K. pneumoniae*

Primeiramente, foram escolhidas duas cepas da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 1706 e A54970, responsáveis por quadros severos de pneumonia, principalmente em pacientes imunocomprometidos, e pelo aumento da resistência a antibióticos em seus isolados (CILLÓNIZ; DOMINEDÒ; TORRES, 2019). A *K. pneumoniae* A54970, além de compartilhar as características da cepa ATCC 1706 hipervirulenta, também é produtora da carbapenemase KPC, enzima responsável pela resistência a antibióticos da classe dos carbapenêmicos, muito utilizados na medicina para tratamento (BARNES et

al., 2017). Após 24 horas de cultivo a 37°C em meio Brain-Heart Infusion de ambas as linhagens separadamente, as OMVs secretadas no meio foram isoladas e caracterizadas. Aqui, as medições em NTA mostraram que foi possível isolar 2×10^{10} OMVs/mL de ambas as cepas (Figura 4A); o tamanho médio das OMVs variou entre 115 e 250 nm (Figura 4B), enquanto a moda, ou seja, os valores de tamanho que aparecem com maior frequência nas análises, variaram entre 80 e 200 nm (Figura 4C). OMVs extraídos de uma cepa multirresistente de *K. pneumoniae* mostraram um pico que variou entre 100 e 300 nm em tamanho medido por NTA (YE et al., 2021). O diâmetro hidrodinâmico médio, obtido por medições DLS, foi de 89,5 nm para OMVs de *K. pneumoniae* ATCC 1706 e 122,7 nm para OMVs de *K. pneumoniae* A54970. Medidas de potencial zeta mostraram que a carga de superfície de ambas as cepas variou entre -15 e -34 mV (Tabela 2). Nesse sentido, outros estudos envolvendo a caracterização de OMV mostram que cepas suscetíveis e resistentes de *K. pneumoniae* ATCC 700721, o tamanho hidrodinâmico obtido variou entre 90,58 nm e 141,5 nm (JASIM et al., 2018). Da mesma forma, OMVs isolados de *K. pneumoniae* ATCC 1706 e ATCC 10031 apresentaram valores de tamanho hidrodinâmico de 100 nm (ZHANG et al., 2021) e 86,54 nm (MARTORA et al., 2019).

Para a caracterização proteica das OMVs, foram realizados ensaios de BCA comparando amostras obtidas das duas cepas bacterianas (Figura 4D). Ambos apresentaram valores semelhantes de quantidade de proteína variando entre 1 e 1,5 mg/mL. Na análise SDS-Page é possível identificar proteínas de tamanhos iguais tanto nas OMVs quanto em suas respectivas bactérias parentais, indicando a herança de algumas características na formação das OMVs (Figura 4E). As bandas visíveis indicaram proteínas de 55 e 45 kDa, assim como as proteínas de membrana OmpA e OmpK, enfatizando que a biogênese ocorre a partir da membrana externa da bactéria. Bandas semelhantes em outros estudos foram encontradas (HADADI-FISHANI et al., 2021; MOHABATI MOBAREZ et al., 2020; SEDAGHAT et al., 2019). Em todos os estudos mencionados, assim como nas Figuras 4F e 4G, é possível observar que as OMVs geralmente apresentam uma morfologia esférica, com borda escura, o que indica uma forma de bicamada e tamanhos entre 100 e 200 nm. Medidas de potencial zeta mostraram que a carga de superfície de ambas as cepas variou entre -12 e -15 mV.

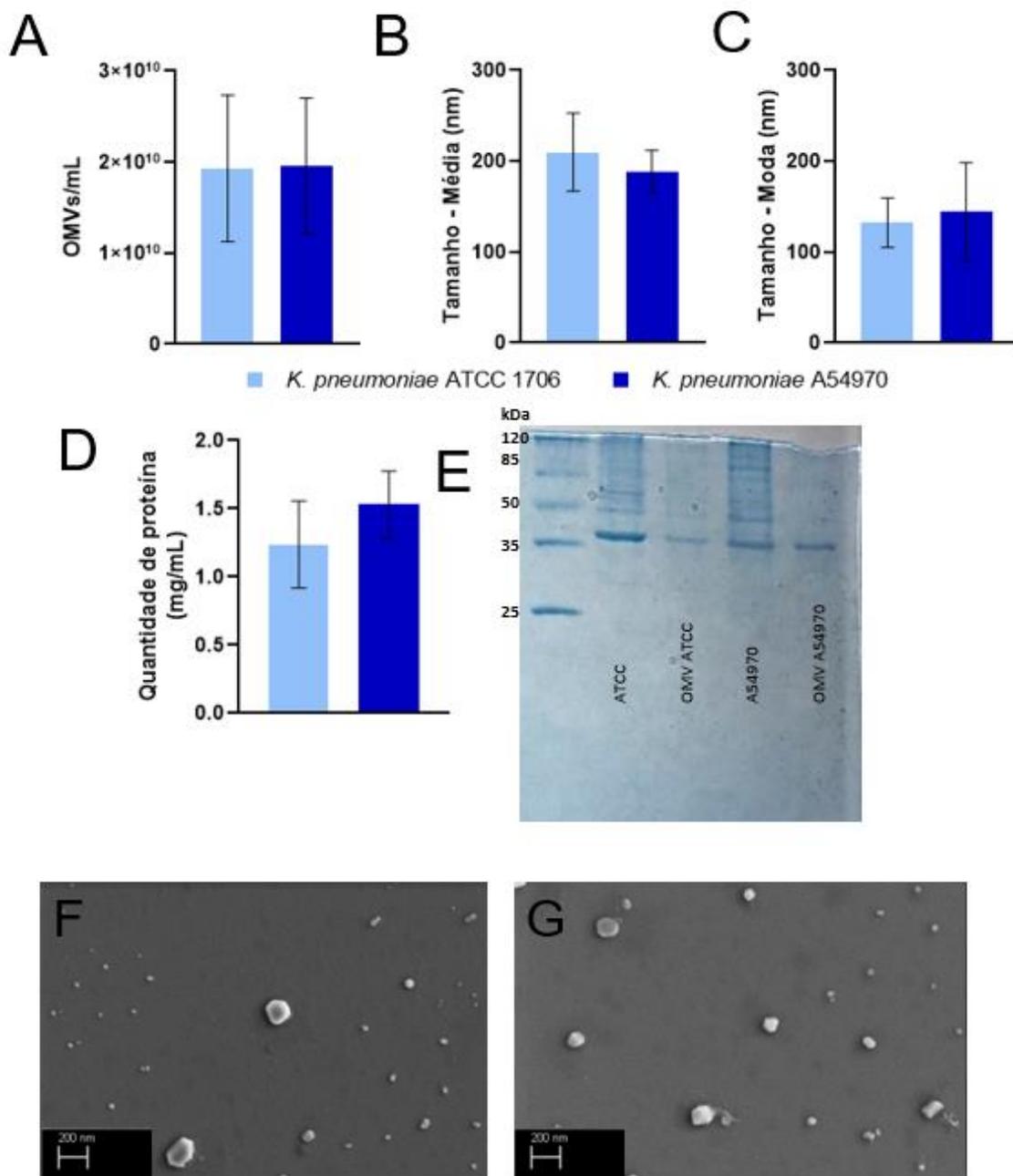


Figura 4. Características de OMVs isoladas de duas cepas diferentes de *K. pneumoniae* cultivadas nas mesmas condições. Os OMVs foram isolados dos sobrenadantes de quantidades iguais de células, com base em OD600 de *K. pneumoniae* ATCC 1706 (azul claro) e *K. pneumoniae* A54970 (azul escuro) e analisados em termos de (A) rendimento (OMV/mL), (B) tamanho médio (nm) e (C) moda de tamanho (nm), medido por NTA; (D) quantificação da proteína obtida a partir do ensaio BCA e (E) SDS-Page, que mostra as bandas de OMV correspondentes às da bactéria parental, nas dimensões de OMPs da literatura. As barras representam valores médios com erros padrão de três réplicas biológicas. Significâncias dos dados analisadas por teste de Welch usando GraphPad Prism 8. Não houve diferença estatística entre os grupos. As imagens SEM mostram a morfologia das OMVs de (F) *K. pneumoniae* ATCC 1706 e (G) *K. pneumoniae* A54970. Fonte: pela autora.

Tabela 2. Duas linhagens diferentes de *K. pneumoniae* produziram OMVs com características semelhantes. Diâmetro hidrodinâmico (nm), dispersão e carga superficial das OMVs medidos por DLS obtidas pelo cultivo de ambas as linhagens de *K. pneumoniae* em meio BHI, por 24 horas a 37°C (n=3, triplicata biológica) (Dados representados por média \pm erro padrão).

Linhagem	Diâmetro hidrodinâmico	PdI	Potencial Zeta
ATCC 1706	89,5 \pm 19,1 nm	0.311 \pm 0,08	- 17.73 \pm 4,1 mV
A54970	122,7 \pm 31 nm	0.402 \pm 0,13	- 24.46 \pm 5,9 mV

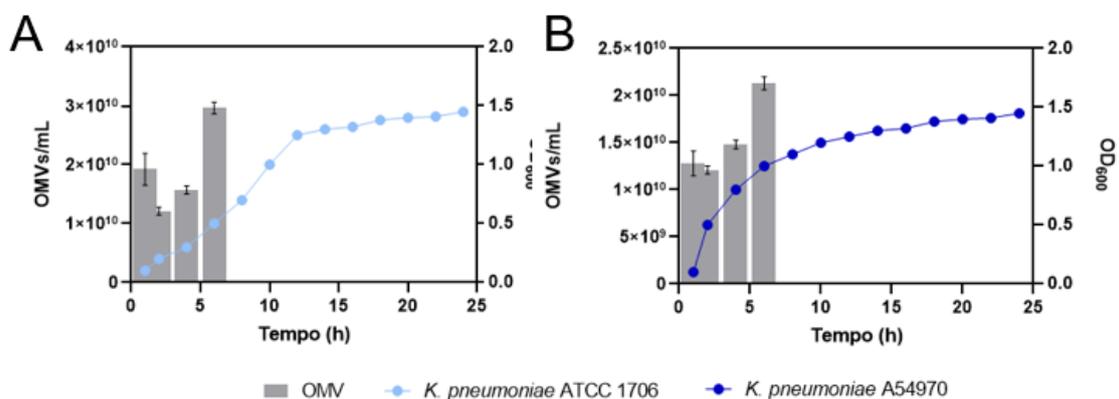
1.4.3. Análise em diferentes fases de crescimento bacteriano

Em geral, as OMVs são naturalmente secretadas em meio de cultura líquido após determinado tempo de cultivo. Portanto, é importante estabelecer as melhores condições da cultura, incluindo a fase de crescimento do cultivo bacteriano, em que será possível obter a maior quantidade de vesículas. Cada fase determina a disponibilidade de nutrientes, concentração de produtos, densidade populacional, e também a quantidade de OMVs, podendo aumentar ou diminuir a produção, bem como alterar o padrão de expressão de proteínas das mesmas (KLIMENTOVA et al., 2019b). Neste estudo, as cepas escolhidas para extração foram cultivadas em meio BHI e o seu crescimento foi acompanhado a cada 30 minutos com base na leitura da densidade óptica (DO). Quando a DO atingiu os valores correspondentes a cada fase da curva de crescimento, o processo de extração das OMVs foi iniciado. Após caracterização de tamanho, quantidade e carga superficial, foi possível observar que a cada fase da curva de crescimento, cada UFC produziu menos vesículas do que na fase anterior. Porém, após a fase estacionária é possível obter a maior quantidade de OMVs, resultante da produção cumulativa das fases anteriores (Figuras 5A e 5B). O acúmulo de vesículas após a fase estacionária pode promover a agregação de partículas, o que pode ser observado no aumento dos tamanhos médio e moda das OMVs isoladas (Figuras 5C e 5D). O potencial zeta também muda com o acúmulo de OMVs, atingindo -15,06 para *K. pneumoniae* ATCC 1706 OMVs e -13,20 para *K. pneumoniae* A54970 OMVs (Figura 5E).

Enquanto OMVs são produzidas em todos os estágios de crescimento bacteriano, a taxa máxima de produção de vesículas é conhecida por ocorrer no final da fase log para várias espécies de bactérias (KLIMENTOVA et al., 2019b). Para investigar o efeito do estágio de crescimento bacteriano no tamanho e rendimento de OMVs, uma cepa modificada de *E. coli* foi cultivada por diferentes períodos de tempo que representam as fases de crescimento pré-logarítmico, médio-logarítmico, pré-estacionário e estacionário.

Foi demonstrado que o rendimento da produção de OMVs é aumentado enquanto as bactérias estão crescendo. Embora a concentração total de proteínas de OMVs isoladas na fase estacionária seja maior do que em outras fases, a fase pré-estacionária apresentou condições mais favoráveis para o isolamento de OMVs devido à liberação de vesículas menores em comparação com outras fases (SHARIF; EFTEKHARI; MOHIT, 2021).

Curiosamente, vesículas liberadas por *P. aeruginosa* durante as fases exponencial e estacionária apresentaram propriedades físicas diferentes, como densidade e carga superficial. Comparando as fases exponencial e estacionária, as OMVs mudaram sua densidade (1,08 a 1,17 g/mL), diâmetro hidrodinâmico (105,2 a 118,8 nm) potencial zeta (-8,4 a -24,8 mV) (TASHIRO et al., 2010b). Além disso, vesículas de culturas de fase estacionária continham níveis mais altos de PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal), um dos reguladores relacionados à produção de OMVs em *P. aeruginosa*. Este resultado sugere que as propriedades das OMVs são alteradas para interagir de forma direta com as células bacterianas enquanto transitam entre as fases de crescimento (TASHIRO et al., 2010a). Portanto, à medida que as bactérias transitam entre a fase de crescimento, as vesículas podem adquirir propriedades inerentemente diferentes que podem influenciar suas interações com as células vizinhas e isso pode ser crucial para a comunicação célula-célula (ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2016). Da mesma forma, *Francisella novicida* produz mais OMVs na fase estacionária inicial do que na a fase logarítmica média e os perfis de proteínas também são diferentes (MCCAIG; KOLLER; THANASSI, 2013). Esses resultados mostram a importância da determinação das curvas de crescimento de cada microrganismo para comparação quantitativa e da composição proteica de OMVs isoladas a partir de diferentes cepas e condições de cultivo.



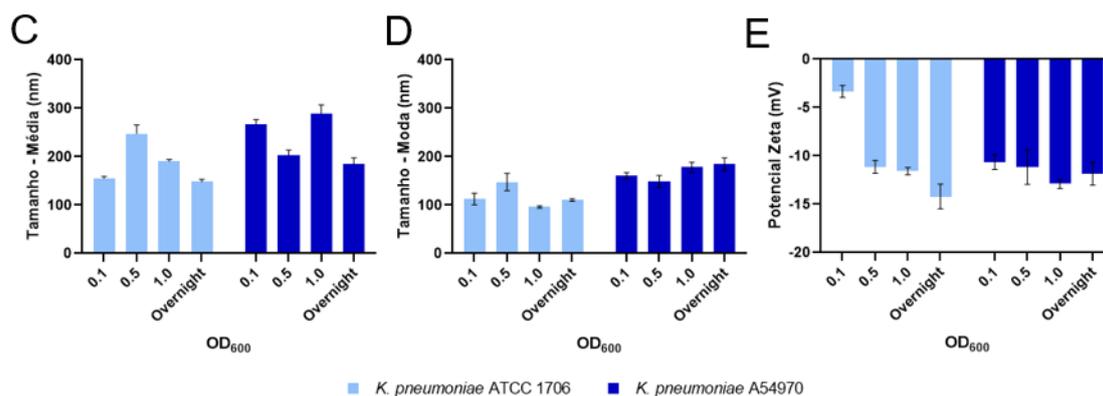


Figura 5. Avaliação das características das OMVs isoladas de ambas as cepas de *K. pneumoniae* em diferentes estágios de cultivo. (A) e (B) Rendimento (OMV/mL); (C) Média dos tamanhos (nm); (D) Modo de tamanhos (nm), medido por NTA e (E) potencial zeta de OMVs, medido por Zetasizer (n=3, triplicata biológica) (Dados representados por média \pm erro padrão). Significâncias dos dados analisadas por teste de Welch usando GraphPad Prism 8. Não houve diferenças estatísticas. Fonte: pela autora.

1.4.4. Comparação entre diferentes tempos de cultivo

A partir da observação do acúmulo de OMVs produzidas após a fase estacionária, o cultivo foi estendido por até 96 horas, a fim de otimizar o processo de extração e obter um número maior de vesículas. O resultado foi um aumento da quantidade em relação ao tempo de overnight, porém atingindo um platô após as primeiras 24 horas de cultivo (Figura 6A). O tamanho médio das vesículas, representado por pontos na Figura 6B, manteve-se na faixa entre 162 e 220 nm e o tamanho moda, representado por barras na Figura 6B, entre 123 e 153 nm durante todas as 96 horas de cultivo (Figura 6B). Como visto no teste anterior, a quantidade de OMVs produzidas por UFC diminui ao longo da curva de crescimento. Além disso, após esse período o cultivo bacteriano passou da fase estacionária para a fase de decaimento, onde os nutrientes do meio de cultura passam a ficar limitados, metabólitos secundários são formados, há mudanças no pH e, conseqüentemente, um maior número de células começa a morrer. Portanto, a manutenção do número de vesículas presentes no meio após as 24 horas é esperada. Esses resultados vão de encontro com estudos realizados a fim de aumentar a produtividade volumétrica do isolamento em batelada de OMVs isoladas de *Neisseria meningitidis* para produção de vacinas meningocócicas. Também foi observado que o número e o tamanho das OMVs produzidas permaneceram constantes com até 600 horas de cultivo (GERRITZEN; MARTENS; WIJFFELS, 2017). No entanto, diferenças significativas no conteúdo de proteína foram mostradas entre OMV extraído nas primeiras 24 horas e em

96 horas para ambas as cepas e entre 48 e 96 horas para *K. pneumoniae* A54970 (Figura 6C).

OMVs foram relatados para empacotar carga bacteriana, incluindo DNA, RNA e proteínas; no entanto, os mecanismos pelos quais a carga proteica é selecionada permanecem obscuros. Além das condições de estresse, que aumentam a produção de OMVs por célula bacteriana, o estágio de crescimento também pode afetar a quantidade, o tamanho da vesícula e a composição da carga, como observado nas alterações nos perfis de proteína das vesículas de *Helicobacter pylori* em 16, 48 e 72 horas de crescimento. Diferentes tempos de cultivo influenciaram o tamanho das OMVs de *H. pylori*, pois as OMVs se tornaram menos heterogêneas em tamanho ao longo do crescimento bacteriano, mas ainda variando de 50 e 350 nm. A análise proteômica global das OMVs de *H. pylori* revelou que a quantidade e a composição da carga de proteína da vesícula mudaram à medida que as OMVs de estágios posteriores do crescimento bacteriano foram enriquecidas em proteínas empacotadas seletivamente envolvidas em vias metabólicas e transporte de aminoácidos (ZAVAN et al., 2019).

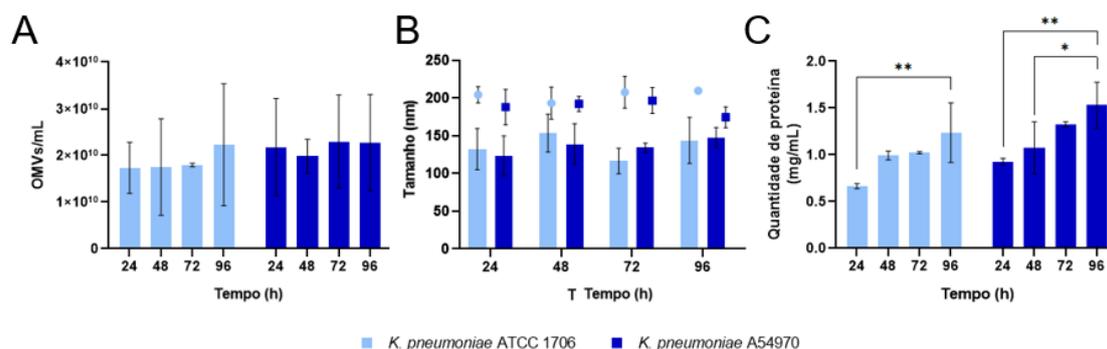


Figura 6. Após 24 horas de cultivo em meio BHI sob agitação a 37°C, as OMVs mantiveram os valores de quantidade produzida e tamanho. Características das OMVs isoladas de ambas as cepas de *K. pneumoniae* cultivadas por diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas), expressas em (A) quantidade (OMV/mL) e (B) tamanho médio (nm), representadas por pontos, e modo de tamanho (nm), representado por barras, medido por NTA e (C) teor de proteína, medido por ensaio de BCA. (n=3, triplicado biológico). Dados representados por média \pm erro padrão. Significâncias dos dados analisadas por variância (ANOVA) usando GraphPad Prism 8. As significâncias são indicadas por * para P-Value < 0,05 e ** para P-Value < 0,01. Fonte: pela autora.

1.4.5. Comparação entre meios de cultura

Outro fator crítico que afeta as propriedades das OMVs é a seleção do meio de crescimento. As duas cepas de *K. pneumoniae* foram cultivadas a 37°C, por 24 horas sob

agitação, em três diferentes meios de cultura: caldo BHI, caldo Mueller-Hinton (MH) e caldo Luria-Bertani (LB). Os meios de cultura BHI e LB são classificados como quimicamente complexos, de modo que a composição química exata dos nutrientes é levemente variável, pois são obtidos através de extrato de leveduras, carnes ou plantas. Por outro lado, o caldo MH é classificado como meio de cultura quimicamente definido, pois a composição exata de cada nutriente é conhecida (TORTORA, FUNKE, CASE, 2017). Neste teste foi possível observar que os meios complexos apresentaram um rendimento maior de OMVs em ambas as cepas em comparação a MH, um meio de cultura definido (Figura 7A). No entanto, a diferente composição dos meios de cultura não afetou o tamanho das vesículas, que se manteve na faixa entre 120 e 200 nm (Figura 7B). Similarmente, a comparação entre meios de cultura quimicamente definidos e complexos revelou que em BHI, *Francisella tularensis* exibe um fenótipo adaptado ao hospedeiro com estruturas de superfície alteradas (ZARRELLA et al., 2011). As mudanças são atribuídas principalmente a baixas concentrações de aminoácidos livres nos meios complexos e como consequência dessa adaptação, a produção de OMV também é aprimorada nesse tipo de cultivo.

Nos ensaios de BCA, foi possível observar a diferença entre meios de cultura quimicamente definidos e complexos, principalmente quando se comparam os caldos MH e BHI. Em ambas as cepas, o BHI demonstrou capacidade de estimular a expressão de proteínas de membrana, que podem ser herdadas durante a formação de OMVs. Vacinas de OMV de *Bordetella pertussis* cultivadas em diferentes meios de cultura foram comparadas e diferiram não só no conteúdo proteico, mas também na imunogenicidade das vesículas (DE JONGE et al., 2021). Neste caso, a influência da fonte de carbono e a disponibilidade de nutrientes metálicos, como o ferro e o zinco, afetam diretamente o padrão de expressão das proteínas, uma vez que as vesículas servem de sistema de transporte de nutrientes para a bactéria parental (GASPERINI et al., 2017; LIN et al., 2017).

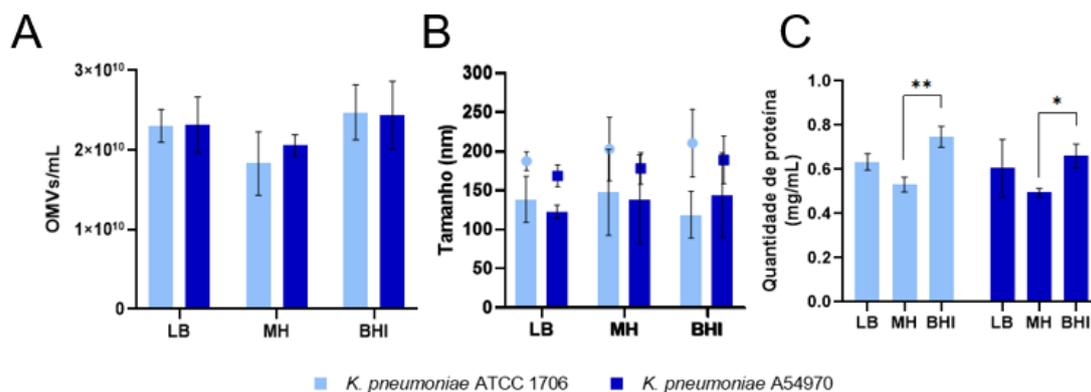


Figura 7. Meios de cultura com diferentes composições induzem a produção de OMV com diferenças no teor de proteína. (A) Rendimento (OMV/mL) e (B) tamanho (representado por pontos) e tamanho do modo (representado por barras), medido por NTA, e (C) teor de proteína obtido por ensaio de BCA do processo de extração de OMVs de ambas as estirpes de *K. pneumoniae* cultivadas em meios de cultura Luria Bertani (LB), Mueller-Hinton (MH) e Brain-Heart Infusion (BHI) (n=3, triplicata biológica). Dados representados por média \pm erro padrão. Significâncias dos dados analisadas por variância (ANOVA) usando GraphPad Prism 8. As significâncias são indicadas por * para P-Value < 0,05 e ** para P-Value < 0,01. Fonte: pela autora.

1.4.6. Comparação em cultivos com diferentes disponibilidades de oxigênio

A disponibilidade de oxigênio no meio também é fator determinante no crescimento das células bacterianas e também na modulação da produção de OMVs por outros microrganismos, como a *Pseudomonas aeruginosa* (ORENCH-RIVERA; KUEHN, 2016), bactéria Gram-negativa também associada a casos de pneumonia. Neste teste, todos os cultivos passaram 24 horas a 37°C e foram separados em 3 grupos: os que foram mantidos sob agitação a 150 rpm, os que foram mantidos estáticos e os que foram mantidos em incubadora a 5% de CO₂. Além disso, em cada uma dessas condições haviam cultivos em tubo teste de 15 mL (Figura 8A) e em placa de 6 poços (Figura 8B), de forma que a superfície para troca de gases fosse alterada de 3,5 cm para 1,5 cm, respectivamente. Considerando que nas condições Estático e CO₂, onde a densidade populacional é limitada pela disponibilidade de oxigênio, o rendimento de OMVs produzidas por UFC é maior em relação à condição Agitação, especialmente para *K. pneumoniae* ATCC 1706, que apresentou diferença significativa entre as condições Agitação e CO₂, enquanto para *K. pneumoniae* A54970 a maior diferença foi mantida entre as condições Estática e CO₂. Isso pode acontecer porque quando o cultivo ocorre em câmara de 5% de CO₂ sem agitação, a disponibilidade de oxigênio é muito menor, podendo até alterar o pH do meio e favorecer a produção de OMVs devido à situação de risco. No entanto, a faixa de

tamanho de partícula de OMVs de cultivo em placa de 6 poços e tubo de ensaio de 15 mL foi semelhante, variando entre 100 e 250 nm (Figura 8). Este resultado mostra que uma maior superfície de troca gasosa e a disponibilidade e dispersão de oxigênio no meio influenciam não só o crescimento da cultura, mas também a produção de OMVs, especialmente para espécies anaeróbicas facultativas como *K. pneumoniae*.

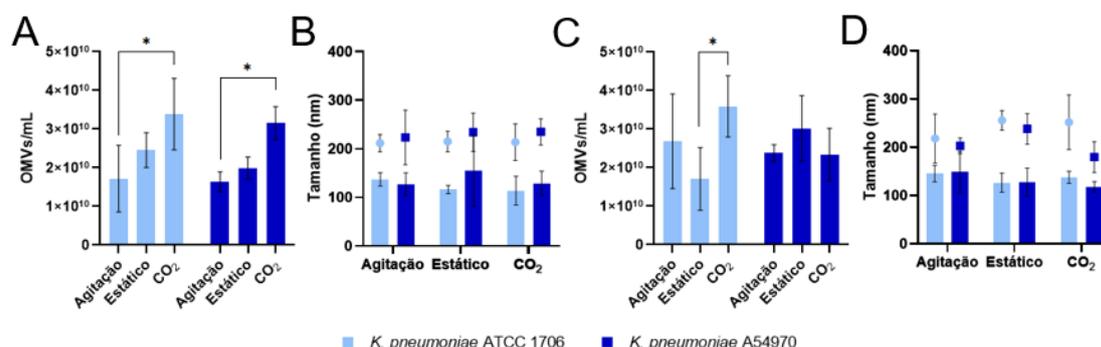


Figura 8. A disponibilidade de oxigênio durante o cultivo interfere na secreção de OMVs no meio. Rendimento (OMV/mL) e tamanho (pontos) e tamanho do modo (barras) medidos por NTA, do processo de extração de OMVs de ambas as cepas de *K. pneumoniae* cultivadas em (A) e (B) tubo de ensaio de 15 mL e (C) e (D) 6- placa de 6 poços a 37°C sob agitação a 150 rpm (Agitação, cultura estática (Estático) e em incubadora com 5% de CO₂ (CO₂) (n=3, triplicata biológica). Dados representados por média ± erro padrão. Significâncias dos dados analisadas por variância (ANOVA) usando GraphPad Prism 8. As significâncias são indicadas por * para P-Value < 0,05. Fonte: pela autora.

1.5. Conclusão

A caracterização das OMVs secretadas pelas cepas da bactéria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 e A54970 revelou informações importantes sobre sua quantidade, tamanho, composição proteica e propriedades físicas. Através das medições em NTA, observou-se a presença de aproximadamente 2×10^{10} OMVs/mL para ambas as cepas, com tamanhos médios variando entre 115 e 250 nm. A análise de proteínas mostrou a presença de proteínas semelhantes tanto nas OMVs quanto nas bactérias parentais, indicando uma herança de características na formação das vesículas. Além disso, foi observado que as OMVs apresentavam uma morfologia esférica e uma carga de superfície negativa.

Foi destacado que as condições de cultivo bacteriano, incluindo a fase de crescimento, desempenham um papel importante na produção de OMVs. Verificou-se que a fase estacionária é a fase em que é possível obter a maior quantidade de vesículas, resultante da produção cumulativa das fases anteriores. Além disso, estudos anteriores

mostraram que diferentes estágios de crescimento bacteriano podem afetar o tamanho, a composição proteica e as propriedades físicas das OMVs.

Outro fator crítico mencionado foi a seleção do meio de cultura, onde os meios complexos, como BHI e LB, mostraram um rendimento maior de OMVs em comparação com o meio de cultura definido MH. Essa diferença na composição dos meios pode afetar a produção e a composição das vesículas.

Em resumo, os resultados nesta análise contribuem para o conhecimento sobre as características das OMVs secretadas pelas cepas de *K. pneumoniae* estudadas, destacando a influência do estágio de crescimento bacteriano e do meio de cultura na produção e nas propriedades dessas vesículas. Mais testes de caracterização funcional são necessários para confirmar quais as melhores condições de cultivo para aplicações específicas, como caracterização proteômica, ou de internalização das vesículas isoladas em células de diferentes linhagens, e até mesmo atividades antimicrobianas e citotóxicas. Essas informações são relevantes para estudos futuros sobre o papel das OMVs em processos patogênicos e seu potencial uso em aplicações médicas, como vacinas e terapias.

2. CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM REVESTIMENTO DE OMVs

2.1. Introdução

Os compostos naturais, presentes na natureza como uma valiosa coleção de fármacos para tratar doenças, são conhecidos por apresentarem uma ampla gama de atividades farmacológicas e poucos efeitos colaterais. Possuem diferentes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, reguladoras de enzimas e moduladoras da replicação do DNA, o que tem despertado grande interesse na comunidade científica. Além disso, eles oferecem diversas opções de administração segura, flexibilidade na prescrição individual e uma variedade de preparações. Devido a essas características excepcionais, os produtos naturais são identificados como compostos-chave no desenvolvimento de medicamentos e como fontes diretas de fármacos naturais. Com isso, há um esforço para desenvolver formulações eficazes e de fácil administração para esses compostos, especialmente na tecnologia farmacêutica (YU et al., 2022).

No entanto, algumas moléculas enfrentam desvantagens que limitam sua aplicação em sua forma natural ou resultam em efeitos terapêuticos pouco expressivos. A curcumina, um composto natural derivado do rizoma da *Curcuma longa* L., possui diversas propriedades terapêuticas, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (PATEL et al., 2020). Entretanto, sua baixa solubilidade em água e rápida metabolização limitam sua biodisponibilidade e ação antimicrobiana. Neste sentido, foram desenvolvidos sistemas de transporte para contornar essas limitações, que incluem a baixa de solubilidade em água, baixa estabilidade, absorção e biodisponibilidade reduzidas, além de um rápido metabolismo e excreção do organismo, o que diminui sua eficácia terapêutica (ZIELINSKA et al., 2020).

Por isso, os nanocarreadores oferecem melhor solubilidade e biodisponibilidade para moléculas pouco solúveis, além de melhorar os efeitos preventivos e farmacológicos e reduzir os efeitos adversos. Os nanocarreadores poliméricos são especialmente notáveis devido às suas características físico-químicas únicas. Nas últimas décadas, as nanopartículas poliméricas têm recebido uma atenção significativa e se mostrado uma importante área de pesquisa no campo da liberação controlada de fármacos (ELMOWAFY et al., 2023). No entanto, as nanopartículas podem ser efetivamente identificadas e removidas devido ao complexo ambiente sanguíneo *in vivo*, quando

administradas por via sistêmica. A remoção pelo sistema fagocítico mononuclear tornou-se o principal obstáculo do sistema de entrega de nanofármacos. Além disso, a distribuição inespecífica das nanopartículas *in vivo* causa efeitos colaterais tóxicos (ZENG et al., 2022).

Para contornar essas limitações, as nanopartículas tem recebido um tratamento após a formulação com o recobrimento por membranas celulares biológicas, que resulta em uma nanoestrutura com propriedades similares da célula parental. Dessa forma, essas nanopartículas biomiméticas ganham destaque na interação com substratos biológicos ou biointerface, permitindo que se desloquem de maneira eficaz em ambientes biológicos complexos, evitando a depuração imunológica e acumulando-se especificamente nos locais da doença. O revestimento da membrana celular fornece uma estratégia eficaz de funcionalização de nanopartículas, potencializando o desenvolvimento de plataformas com propriedades desejáveis que podem ser personalizadas para uma ampla gama de aplicações (FANG; GAO; ZHANG, 2023b).

Neste capítulo abordaremos a síntese de nanopartículas poliméricas carregadas com curcumina, um composto natural, obtidas através do método de nanoprecipitação; e a funcionalização deste nanocarreador através do revestimento com vesículas bacterianas de membrana externa. Essas nanopartículas serão posteriormente aplicadas em sistemas de prevenção e tratamento de infecções bacterianas, considerando o efeito sinérgico de composto e revestimento naturais.

2.2. Objetivos e metas

NPs de PLGA com Curcumina Rhodamina B foram preparadas e otimizadas visando o encapsulamento de fluoróforo. As NPs foram caracterizadas em relação às propriedades físico-químicas e à capacidade de encapsulamento do marcador. Também será avaliada a eficiência com que as OMVs revestem e funcionalizam as NPs.

- a. Preparar e otimizar nanopartículas de PLGA contendo Curcumina e Rhodamina B através da técnica de nanoprecipitação;
- b. Caracterizar em triplicata a síntese de NPs por técnicas de microscopia, espalhamento de luz dinâmico (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e potencial zeta;

- c. Sintetizar OM-NCs funcionalizadas com revestimento de OMVs através do método de sonicação;
- d. Caracterizar as OM-NCs por técnicas de microscopia, espalhamento de luz dinâmico (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e potencial zeta;

2.3. Metodologia

2.3.1. Síntese de nanopartículas de PLGA (PLGA-NPs).

Nanopartículas (NPs) de PLGA com fluoróforo foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, empregando o copolímero PLGA na razão 50:50 (ácido lático:ácido glicólico) com extremidade carboxila (#719870, 24000-38000, Resomer® RG 503 H, Sigma Aldrich). A técnica em essência consiste no deslocamento de um solvente orgânico por um solvente aquoso (efeito Marangoni). À fase orgânica, contendo 8 mg de polímero dissolvido em 2 mL acetona e 100 µL de solução estoque de curcumina a 5 mg/mL, foi adicionada uma fase aquosa consistindo em 60 mg de Pluronic® F-127 disperso em 6 mL de água Milli-Q. Os fluoróforos empregados foram 100 µL de solução estoque (10 mg/mL) de Curcumina (#C1386 *Curcuma longa*, Sigma-Aldrich) e 15 µL de solução estoque (10 mg/mL) de Rhodamina B (#83689, Sigma Aldrich). Após a evaporação de todo o solvente da síntese, as nanopartículas foram caracterizadas com técnicas de DLS, NTA, MEV e Potencial Zeta.

Para avaliar a formação de Proteína Corona (PC) com as nanopartículas, a dispersão foi incubada com 500 µL de soro fetal bovino (FBS) por 1 h a 37°C sob agitação constante. As partículas foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 20.000 x g por 30 min. O pellet de partículas foi ressuspensão em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e lavado por três etapas de centrifugação a 20.000 × g por 30 min e subsequentemente redisperso em PBS.

A quantificação da Curcumina e da Rhodamina encapsulada foi realizada por espectroscopia de UV-Vis. A molécula apresenta valor máximo de absorbância em torno de 420-430 nm em água. Uma curva padrão de curcumina livre em PBS foi obtida para verificar a faixa linear do método bem como limite de detecção e quantificação. A eficiência de encapsulamento de PLGA-Cur e PLGA-Rho NPs foi avaliada medindo a fluorescência da síntese primeiramente sem tratamento e, em seguida, após centrifugação separando sobrenadante contendo fármaco livre e excesso de polímero e surfactante. O

sobrenadante também foi avaliado. Amostras de pelo 3 diferentes sínteses foram avaliadas.

2.3.2. Síntese de nanocarreadores revestidos com OMV (OM-NCs).

O revestimento das nanopartículas foi realizado por sonicação. Primeiramente, as PLGA-NPs foram centrifugadas (10000 g, 20 min, 15°C) e ressuspensas em PBS 1x. Foram misturadas diferentes proporções (1:1, 1:2 e 1:5) de PLGA-NP e OMV a fim de obter a melhor funcionalização. Em seguida, as amostras foram submetidas à 20 minutos de em Sonicador Elmasonic P, Elma, a 10°C sob 80 kHz de frequência e 100% de potência. As OMV-NCs foram caracterizadas quanto ao tamanho, distribuição e carga superficial no Zetasizer, quanto à concentração no NTA e quanto à morfologia em Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica Criogênica.

2.3.3. Caracterização das nanopartículas

2.3.3.1. Dynamic Light Scattering (DLS) e Potencial Zeta

A distribuição de tamanho e potencial de carga de superfície das nanopartículas em PBS antes e após o revestimento foi determinado com DLS usando um Malvern Nano ZS Zetasizer (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). Amostras diluídas em triplicata de PLGA-NPs (1:1000) e OM-NCs (1:20) em 1,0 mL de água foram inseridas em cubetas de dimensionamento descartáveis e de leitura de potencial zeta a 25 °C. O diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average) e o potencial de superfície (Potencial Zeta) das nanopartículas antes e após o revestimento foram coletados e analisados com o software Zetasizer.

2.3.3.2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Amostras de nanopartículas antes e após o revestimento foram analisadas usando o NanoSight NTA NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) para determinar a concentração e distribuição de nanopartículas. Um volume de teste de 1,5 mL diluída de PLGA-NPs (1:1000) e OM-NCs (1:20) foi injetado no NTA e analisado em triplicata de vídeo de 60 segundos. Entre as execuções, as amostras foram avançadas para introduzir alíquotas de amostras frescas para quantificação. A sensibilidade da câmera e o limiar de detecção foram otimizados por vídeo e a temperatura foi ajustada para 25 °C. O nível da câmera variou entre 10 e 13 e a média de partículas por quadro variou entre 80 e 100. As

leituras foram analisadas usando o software NTA versão 3.3. A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism Software Versão 8.0 (GraphPadSoftwareInc.).

2.3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica do OMVS foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (FEG-SEM). Os substratos de silício (Sigma-Aldrich) foram limpos com acetona, isopropanol, etanol e água em um banho de ultrassom por 10 minutos cada. Após a limpeza, 10 μ L das amostras foram colocadas nos substratos e secas a vácuo em dessecador, onde permaneceram durante a noite. As imagens foram então obtidas usando um Zeiss Sigma VP FEG-SEM a 3 kV no modo de alto vácuo.

2.3.3.4. Microscopia Eletrônica Criogênica (Cryo-EM)

Para aquisição das imagens e análise da amostra foram utilizadas grades de cobre para microscopia eletrônica, com filme de carbono tipo Lacey, 300 mesh (#01895-F, Ted Pella, EUA). As grades foram tratadas com uma carga de 25 mA por 50 segundos, em equipamento EasyGlow (I) (Ted Pella, EUA). Em seguida, essas grades foram conduzidas ao robô de vitrificação de amostras Vitrobot Mark IV (Thermo Fischer). A amostra foi aplicada em cada grade, realizando o passo de drenagem do excesso Blot time 3 e Blot force -3 e congelando as grades imediatamente em etano líquido. Após esse passo, as grades foram mantidas em nitrogênio líquido até o momento da inserção no microscópio. As imagens foram adquiridas em parceria com o Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em microscópio eletrônico de transmissão modelo Talos F200C (Thermo Fischer), operando a 200kV; o microscópio é equipado com uma câmera Ceta 16M 4k x 4k (Thermo Fischer) para aquisição digital de imagens. As imagens não foram tratadas.

2.4. Resultados e discussão

2.4.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de PLGA (PLGA-NPs)

Em paralelo aos testes de otimização das condições de cultivo bacteriano para aumentar o rendimento do isolamento das OMVs, foi realizada a síntese das nanopartículas de PLGA carregadas com Curcumina (PLGA-Cur) e Rhodamina B (PLGA-Rho) para posterior funcionalização com revestimento de OMVs (Figura 9). A técnica utilizada foi de nanoprecipitação, também chamado deslocamento de solvente.

Neste método, polímero é dissolvido num solvente orgânico polar como, por exemplo, a acetona ou acetonitrila, no qual encontra-se disperso o princípio ativo. Para garantir a estabilidade do sistema e para evitar que as nanopartículas sofram agregação, pode ser utilizado um tensoativo junto à fase orgânica. A fase aquosa é formada por uma solução aquosa, contendo um tensoativo como, por exemplo, o PVA ou Pluronic F127, onde será dispersa a fase orgânica sob agitação magnética. Neste momento, ocorre uma emulsificação espontânea com a formação de um sistema opaco devido à miscibilidade de ambas as fases. Em seguida, ocorre a remoção do solvente orgânico por evaporação, formando as nanopartículas como resultado da difusão rápida do solvente do polímero, através da fase aquosa. (FELTRIN et al., 2022; IVÁN MARTÍNEZ-MUÑOZ; ELIZABETH MORA-HUERTAS, 2022; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

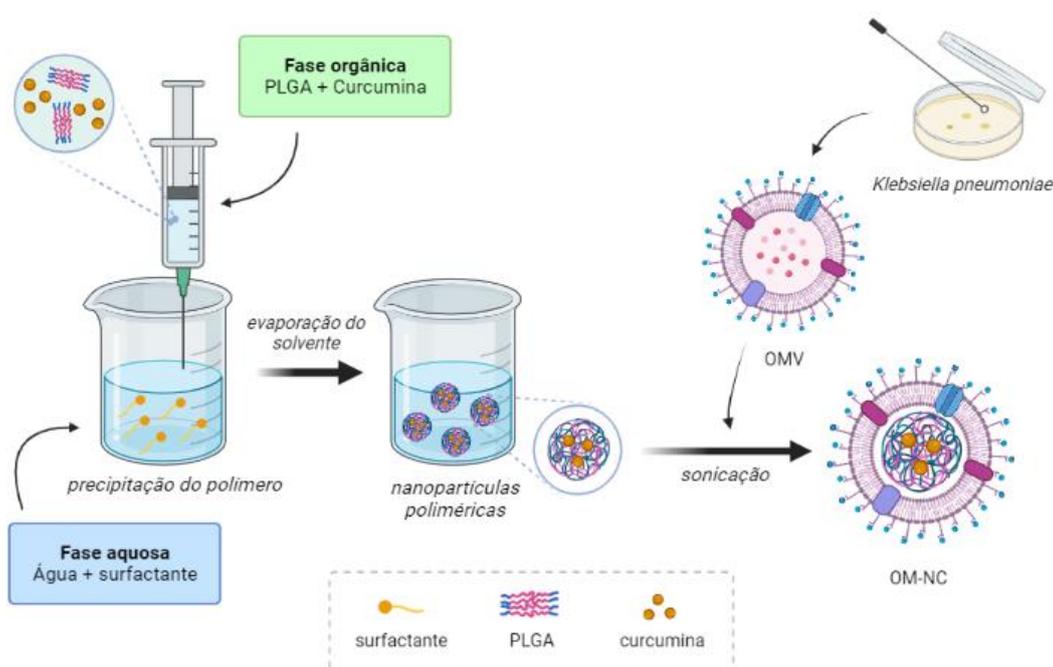


Figura 9. Representação esquemática da síntese de nanopartículas poliméricas carregadas com curcumina, obtidas pelo método de nanoprecipitação, e revestidas por vesículas de membrana externa extraídas de meio líquido condicionado de cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Fonte: pela autora. Criada com BioRender.

A partir dessa técnica, a Tabela 3 mostra as propriedades físico-químicas das nanopartículas obtidas, no qual o diâmetro hidrodinâmico variou entre 89 e 125 nm (PDI = 0,063), com carga superficial negativa (em média -29,5 mV) a uma concentração de 1×10^{11} partículas/mL. A eficiência e encapsulamento da curcumina foi de 69%, com sinal de excitação de fluorescência de 225, resultando na concentração final de 57,4 µg/mL de

curcumina. Já a nanopartícula carregada com Rhodamina B apresentou concentração de 29,11 µg/mL, diâmetro hidrodinâmico de 219 nm (PdI = 0.066), carga superficial de -33,26 mV e eficiência de encapsulamento de 19,4%, com sinal de excitação de fluorescência de 902. Essa diferença de tamanho da partícula e da eficiência de encapsulamento pode ser explicada pela diferença de polarização entre os marcadores encapsulados. Enquanto a molécula de Rhodamina é grande, cheia de anéis aromáticos e altamente hidrofílica, a da curcumina é menor e altamente hidrofóbica. Isso significa que a tendência da Rhodamina permanecer fora da partícula, na fase aquosa, é maior; e o inverso acontece com a curcumina. Quando incubadas com meio de cultura e analisadas quanto a formação de Proteína Corona por técnica de espalhamento de luz, as nanopartículas apresentaram diâmetro de, em média, 271,12 nm (PdI = 0,433). Ambas as nanopartículas tiveram sua carga superficial modificada, em relação às partículas de PLGA vazias, tornando-se mais negativa, enquanto a nanopartícula de Rhodamina B teve seu tamanho aumentado e a de curcumina, diminuído.

As PLGA-NPs obtidas por nanoprecipitação são, em geral, menores (70–275 nm) do que as obtidas através de outras técnicas. Nanopartículas de PLGA PEGiladas com curcumina, conjugadas com diferentes compostos de direcionamento, como ácido fólico, ou ácido hialurônico ou transferrina, foram utilizadas para melhorar a eficácia terapêutica da curcumina no tratamento do câncer de mama. A técnica utilizada foi nanoprecipitação, resultando em nanopartículas de cerca de 200 nm e eficiência de encapsulamento de 66% (PRABHURAJ et al., 2020). Em outro estudo, o efeito antimicrobiano de nanopartículas de PLGA com curcumina modificadas foi avaliado contra espécies Gram-negativas e Gram-positivas, a fim de melhorar a entrega do composto no meio. As nanopartículas tiveram diâmetros variando entre 132 e 185 nm e potencial zeta variando entre -33,1 e -29,1 (GAO et al., 2020). Por outro lado, nanopartículas de PLGA conjugadas com Rhodamina B através da técnica de nanoprecipitação foram obtidas como modelo de delivery de fármacos do nariz até o cérebro. As nanopartículas apresentaram diâmetro de 190,2 nm (PdI=0,198) e carga superficial de -27,7, corroborando com os valores obtidos neste estudo (CRAPARO et al., 2021).

Tabela 3 – Tamanho e distribuição de medidas por DLS, potencial Zeta, eficiência de encapsulamento (EE%) e concentração final da curcumina no polímero (n=3, triplicata biológica)

	Diâmetro hidrodinâmico	PdI	Potencial Zeta	EE%
PLGA	132 ± 99 nm	0,278 ± 0,11	-20.76 ± 6,69 mV	-
PLGA-Cur	102.63 ± 25 nm	0,063 ± 0,031	-29.5 ± 5,51 mV	69.1 ± 10,4%
PLGA-Rho	219.46 ± 61 nm	0,066 ± 0,096	-33.26 ± 4,94 mV	19.41 ± 5,87%

2.4.2. Síntese e caracterização de nanopartículas revestidas com OMV (OM-NCs)

Por fim, as OMVs extraídas foram funcionalizadas com as nanopartículas poliméricas carregadas de Curcumina e Rhodamina B. Para isso, ambas as partes foram misturadas em diferentes proporções e submetidas à sonicação por 20 minutos a baixas temperaturas e posteriormente caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas. As medidas de caracterização com técnicas de NTA, DLS e Potencial Zeta estão representadas na Tabela 4. Com base nos dados obtidos, a proporção de 1:2 (PLGA:OMV) para funcionalização foi a escolhida como mais adequada, visto que apresentou valores de tamanho e polidispersividade mais homogêneos, enquanto os outros valores permaneciam em intervalos bastante parecidos.

Tabela 4 – Concentração em partículas/mL, tamanho médio e moda, medidos por NTA; diâmetro hidrodinâmico, polidispersividade e Potencial Zeta, medidos em Zetasizer dos nanocarreadores funcionalizados a partir de diferentes proporções de nanopartículas de PLGA e OMV. (n=3, triplicata biológica)

Proporção (PLGA:OMV)	Part/mL	Tamanho	Moda	Diâmetro hidrodinâmico	PdI	Potencial Zeta
1:1	2,3 x 10 ⁹ ± 1,18 x 10 ⁸	175,3 ± 30,7 nm	123,2 ± 8,7 nm	380,4 ± 142,6 nm	0,60 ± 0,21	-5,27 ± 4,84 mV
1:2	2,49 x 10 ⁹ ± 1,24 x 10 ⁸	167,8 ± 26,6 nm	123,8 ± 9 nm	189,4 ± 33 nm	0,45 ± 0,06	-5,22 ± 4,74 mV
1:5	2,3 x 10 ⁹ ± 1,35 x 10 ⁸	205,7 ± 25,3 nm	153,0 ± 22,4 nm	270,8 ± 103,9 nm	0,65 ± 0,16	-6,39 ± 5,91 mV

A partir da proporção escolhida, foi possível obter OM-NPs a uma concentração de 3 x 10¹⁰ partículas/mL (Figura 10A), com tamanho final variando entre 150 e 200 nm (Figura 10B), relativamente maiores do que as OMVs e nanopartículas separadamente. Já a carga superficial aumentou quanto maior foi a proporção de OMVs utilizadas (Figura 10C). As nanopartículas e os nanocarreadores foram caracterizados por Microscopia

Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica Criogênica (Cryo-EM) e as imagens estão representadas na Figura 11.

Da mesma forma, OMVs isoladas de *Helicobacter pylori* foram utilizadas para revestir nanocarreadores poliméricos de PLGA pelo método de sonicação. Após a caracterização, as nanopartículas finais apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 105,7 3,1, nm aumentando em aproximadamente 18 nm em comparação com os núcleos de PLGA puros, consistente com a adição de uma fina bicamada lipídica na superfície das nanopartículas. Enquanto isso, o potencial zeta de superfície das nanopartículas mudou de -40,6 mV de núcleos PLGA puros para -28,8 mV das nanopartículas funcionalizadas. A diminuição do potencial zeta indica o efeito de triagem de carga conferido pela membrana revestida. Para verificar o revestimento da membrana, OM-NPs foram examinados com microscopia eletrônica de varredura (MEV) e criogênica (Cryo-EM) para morfologia. Sob o microscópio, os OM-NPs mantiveram a forma esférica dos núcleos poliméricos com uma casca fina na superfície externa, consistente com a estrutura núcleo-casca relatada anteriormente do revestimento de membrana unilamelar em PLGA núcleos (ZHANG et al., 2019b).

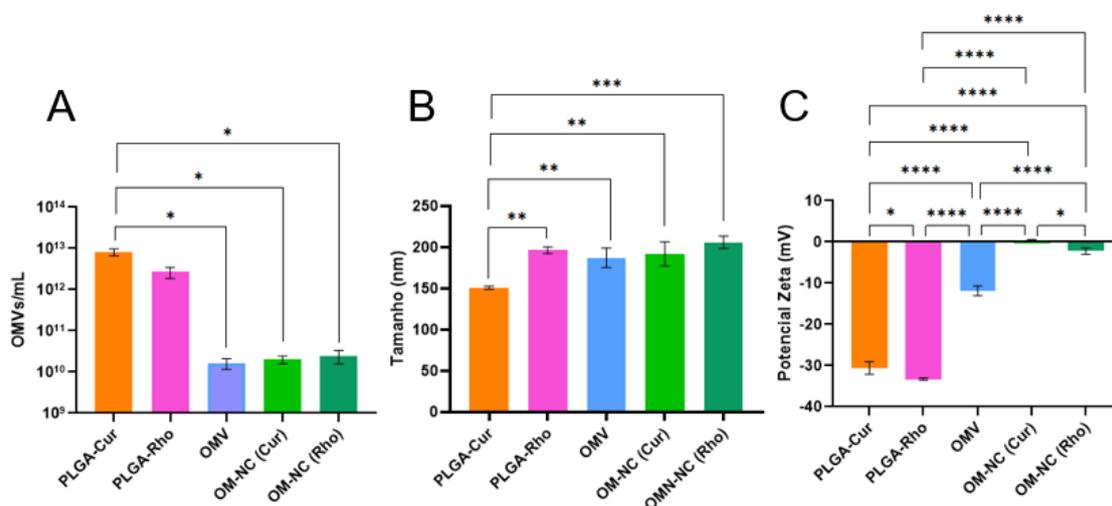


Figura 10. As propriedades físico-químicas da nanopartícula são alteradas conforme a etapa de funcionalização. Comparação de (A) Rendimento (OMV/mL), (B) Tamanho (nm) e (C) Carga superficial (mV) das nanopartículas de PLGA com curcumina (PLGA-Cur), PLGA com Rhodamina B (PLGA-Rho), OMVs não funcionalizadas (OMV), nanocarreadores de PLGA com curcumina revestidas por OMV na proporção 1:2 (OM-NP Cur) e concentradas (OM-NP Rho). (n=3, triplicata biológica). Dados representados por média \pm erro padrão. Dados analisados por análise de variância (ANOVA). Significâncias estão indicadas por * para P-Value < 0,05; ** para P-Value < 0,01; *** para P-Value < 0,001; e **** para P-Value < 0,0001. Fonte: pela autora.

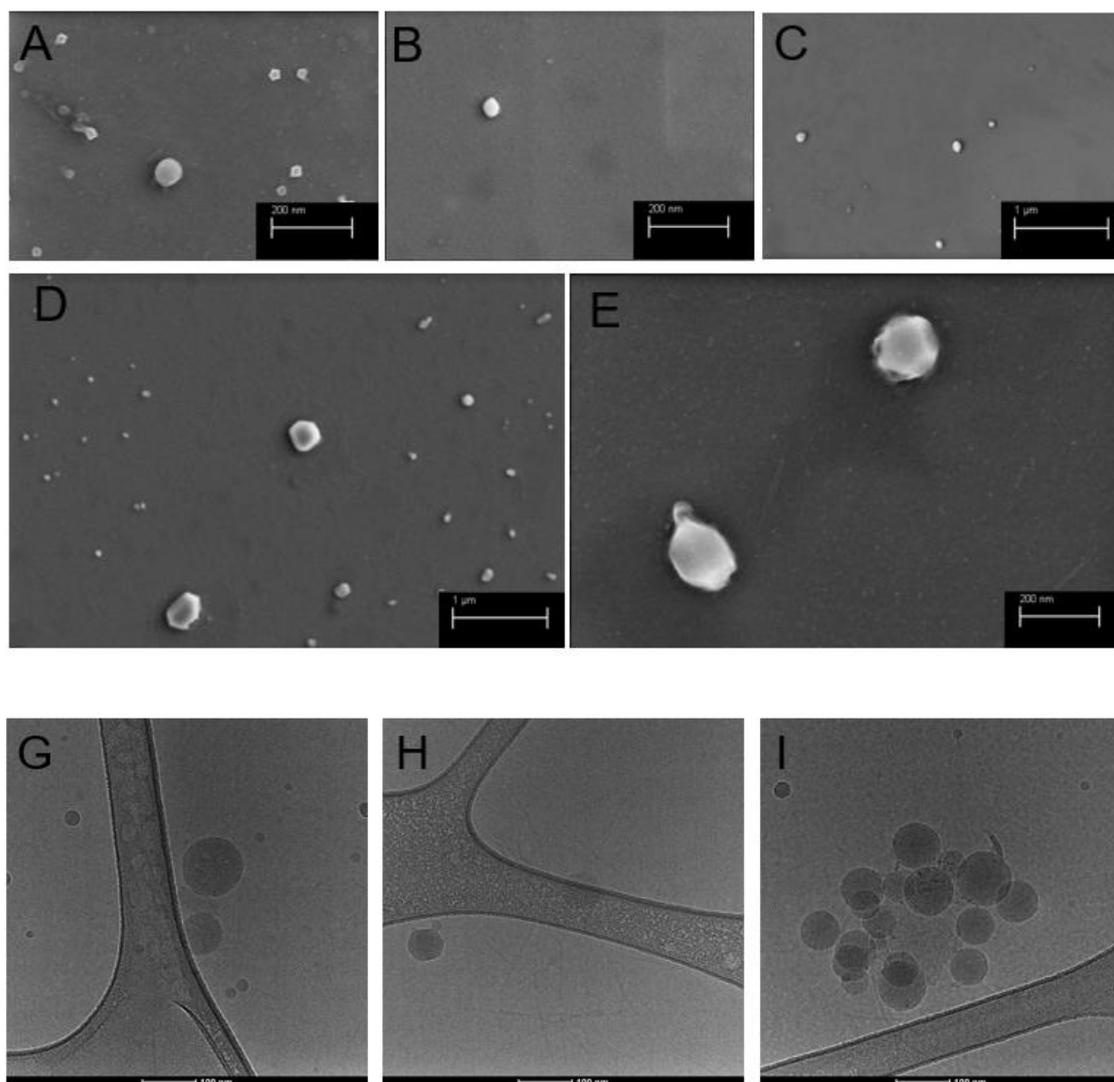


Figura 11. Características estruturais são alteradas com a funcionalização dos nanocarreadores. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de (A) Nanopartículas de PLGA; (B) Nanopartículas de PLGA com Curcumina (PLGA-Cur); (C) Nanopartículas de PLGA com Rhodamina; (D) OMV extraída de *K. pneumoniae* ATCC 1706; (E) Nanocarreadores de PLGA revestidos por OMV (OM-NC). (G-I) Morfologia dos nanocarreadores de PLGA funcionalizados com revestimento de OMVs bacterianas (OM-NC). Imagens de Microscopia Eletrônica Criogênica.

2.5. Conclusão

O uso da técnica de nanoprecipitação permitiu a síntese de nanopartículas de PLGA carregadas com Curcumina e Rhodamina B. As propriedades físico-químicas das nanopartículas foram avaliadas, incluindo seu diâmetro hidrodinâmico, carga superficial e eficiência de encapsulamento. As nanopartículas obtidas apresentaram tamanhos adequados para aplicações terapêuticas, com eficiência de encapsulamento satisfatória. Além disso, a modificação da carga superficial das nanopartículas e a capacidade de direcionamento foram demonstradas em estudos anteriores, mostrando o potencial dessas

nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos e direcionamento para tratamentos específicos.

A funcionalização das OMVs com as nanopartículas poliméricas carregadas de Curcumina e Rhodamina B também foi realizada com sucesso. As propriedades físico-químicas das OMVs funcionalizadas foram caracterizadas, revelando um aumento no tamanho e na carga superficial das partículas em relação às OMVs e nanopartículas isoladas. Essa estratégia de funcionalização das OMVs com nanopartículas pode conferir novas propriedades e funcionalidades às vesículas, ampliando seu potencial de aplicação em terapias biomédicas.

Estudos anteriores também destacaram o potencial terapêutico das OMVs, tanto isoladas quanto funcionalizadas. As OMVs têm sido utilizadas para o tratamento de diversas condições, incluindo o câncer e doenças inflamatórias, devido às suas propriedades imunomoduladoras e capacidade de transporte de moléculas bioativas.

Em resumo, a combinação das nanopartículas poliméricas carregadas com Curcumina e Rhodamina B com as OMVs representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos e terapias biomédicas avançadas. Essa abordagem oferece a possibilidade de direcionamento, proteção e liberação controlada de moléculas terapêuticas, aproveitando as propriedades das nanopartículas e das vesículas biológicas. No entanto, é importante ressaltar que são necessários estudos adicionais para avaliar a eficácia e a segurança desses sistemas em modelos *in vitro* e *in vivo*, visando sua futura aplicação clínica.

3. CAPÍTULO 3 – APLICAÇÃO DE NANOCARREADORES DE OMV NA ADESÃO BACTERIANA E MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE

3.1. Introdução

As infecções respiratórias inferiores são responsáveis por uma alta taxa de mortalidade global, especialmente em países de baixa renda. A pneumonia é a principal causa de morte infecciosa na Europa, nos Estados Unidos e em crianças menores de 5 anos em todo o mundo. No Brasil, é a principal causa de internações e sua mortalidade intra-hospitalar tem aumentado devido ao envelhecimento da população e ao surgimento de casos mais difíceis de tratar. A pneumonia bacteriana é uma infecção grave nos pulmões, muitas vezes precedida por uma infecção viral do trato respiratório superior e se não tratada, pode levar a complicações graves e até à morte.

Assim como outras infecções bacterianas, a pneumonia se inicia quando bactérias patogênicas aderem às células e tecidos do hospedeiro. A adesão bacteriana e a invasão nos tecidos pulmonares desencadeiam uma resposta inflamatória que causa os sintomas respiratórios característicos da pneumonia. Por esse motivo, terapias que visam inibir essa adesão se tornaram uma abordagem atrativa no combate às infecções. Ao contrário dos antibióticos convencionais, essas terapias anti-adesão têm menor probabilidade de causar resistência, pois não interferem diretamente nos ciclos bacterianos que levam à morte. Reduzir a adesão bacteriana também pode facilitar a eliminação do patógeno pelo sistema imunológico do hospedeiro. Essas vantagens levaram ao desenvolvimento de vários compostos antiaderentes, visando adesinas específicas do patógeno, bloqueando sua ligação ao hospedeiro, enquanto outros atuam como análogos de adesinas bacterianas, competindo com as bactérias pelos locais de ligação no hospedeiro.

Recentemente, as nanopartículas revestidas com membrana celular surgiram como uma abordagem biomimética para o tratamento antimicrobiano contra doenças infecciosas. Neste sentido, as nanopartículas revestidas com vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs) aproveitam as funções da bactéria parental e, portanto, têm a capacidade de inibir a adesão de suas bactérias patogênicas parentais à célula hospedeira, ligando-se competitivamente ao mesmo local-alvo.

Por herdarem características da bactéria parental, as OMVs contêm padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que ativam receptores de reconhecimento

de padrão (PRRs) nas células hospedeiras, desencadeando várias vias imunes, incluindo respostas de memória celular e humoral. As OMVs também possuem propriedades adjuvantes intrínsecas devido à presença de PAMPs como LPS, flagelina, lipoproteínas e peptidoglicanos, que interagem com TLRs e induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Quando estes componentes interagem com células e receptores do sistema imunológico, principalmente com os macrófagos, estes adquirem um fenótipo conhecido como M1, ou “macrófagos classicamente ativados (pró-inflamatórios)”. Esses macrófagos são caracterizados por uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e alta apresentação de antígenos, que desempenham um papel crítico na promoção da inflamação, matando microrganismos e lutando contra tumores.

Aqui, inspirados pela capacidade antivirulência das nanopartículas revestidas com membrana celular, revestimos nanopartículas poliméricas em OMVs e fizemos testes de anti-adesão contra bactérias patogênicas. Nossa hipótese é que, ao herdar adesinas bacterianas naturais, os nanocarreadores de membrana externa (OM-NCs) podem competir com as bactérias de origem por locais de ligação e, assim, inibir a adesão bacteriana ao hospedeiro. Além disso, devido às suas propriedades imunomodulatórias, avaliamos também a capacidade dos nanocarreadores em interagirem com macrófagos e na sua consequente expressão de fenótipo classicamente ativado, para garantir o efeito terapêutico do revestimento com membranas bacterianas.

3.2. Objetivos e metas

Neste capítulo avaliamos a capacidade de internalização dos nanocarreadores em células hospedeiras, bem como a habilidade de inibição da adesão de diferentes espécies de bactérias nas células pulmonares na presença de OM-NC em ensaios competitivos. Por fim, foram verificados se marcadores imunológicos específicos da patologia são ativados perante o uso do tratamento.

- a. Cultivar as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* de acordo com os protocolos estabelecidos pela ATCC®;
- b. Cultivar as linhagens celulares A549, Raw 264.7 e C1498 de acordo com os protocolos estabelecidos pela ATCC®;

- c. Confirmar a interação das OM-NCs nas células A549 através de ensaios de microscopia confocal de fluorescência e de citometria de fluxo;
- d. Verificar a capacidade anti-adesão das OM-NCs em análises de microscopia confocal de fluorescência após ensaios de pré-incubação e competitivo e ensaio de dosagem;
- e. Analisar se as OM-NCs possuem a capacidade de descolar a bactéria previamente aderida às células pulmonares, bem como as influências do tempo de incubação e dosagem;
- f. Verificar o perfil de polarização de macrófago em contato com as OM-NCs através da quantificação de marcadores de polarização por citometria de fluxo.

3.3. Metodologia

3.3.1. Cultura de células

Células epiteliais alveolares humanas (A549), macrófagos leucêmicos de camundongo (Raw 264.7) e linfoblastos de camundongos com leucemia mieloide aguda (C1498) serão cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Vitrocell or Gibco #21885025) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) de glutamina, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Diariamente o crescimento celular foi acompanhado utilizando-se microscópio invertido. Todas as manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar.

3.3.2. Linhagens bacterianas

As cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 foram pré-cultivadas em meio Brain-Heart Infusion (BHI) a 37°C com agitação a 150 rpm por 18-24 horas. O crescimento bacteriano foi acompanhado utilizando-se medidas de densidade óptica. Todas as manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar.

3.3.3. Atividade Antimicrobiana - Mínima Concentração Inibitória (MIC)

A atividade antimicrobiana das OM-NCs foi determinada através da mínima concentração inibitória (MIC) usando o método de microdiluição em caldo usando uma placa de 96 poços, conforme protocolos descritos (CLSI, 2008). As OM-NCs foram diluídas em série em caldo Mueller Hinton (#M319, HiMedia), seguido pela adição de 1×10^5

UFC/mL de *K. pneumoniae*. Cada placa é suplementada com controle de veículo (1% DMSO), controle positivo, e controles negativos. Uma das placas foi irradiada com luz azul a 50 kJ por 15 minutos para potencializar o efeito da curcumina. A MIC é comparada com a da curcumina livre (concentração inicial de 2 mg/mL) e é determinada após incubação por 24 horas a 37 °C através da menor concentração de composto que inibe o crescimento bacteriano. A leitura de o teste é realizada após a incubação de 30 µL de Resazurina (#14322, Cayman Chemical Company) 0.015% por 2 horas a 37 °C. Foi utilizado um leitor de placas Spectra Max M3 (Molecular Devices) em absorvância de 600 nm. Também para avaliar o efeito microbicida das OM-NCs carregadas com Curcumina, o crescimento microbiano foi acompanhado por 24 horas através da densidade óptica (OD₆₀₀) após o tratamento utilizando a técnica de microdiluição.

3.3.4. Internalização em células hospedeiras.

Os ensaios de internalização celular foram realizados analisando a absorção de OMV pelas linhas celulares A549 e Raw 264.7. As OMVs fluorescentes foram produzidas através da marcação com Rhodamina B. As células foram semeadas em placas de 12 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e deixadas aderir durante a noite. Posteriormente, as células foram incubadas com OM-NCs fluorescentes de ambas as cepas a 5×10^{10} partículas/mL, por 2, 6 e 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS e ressuspensas com 0,5% Solução BSA-Isoton. A suspensão celular foi analisada por citometria de fluxo em um FACSCalibur (BDBiosciences) usando células não tratadas como controles. Três réplicas biológicas independentes (n = 3) foram realizadas para cada linhagem celular e os dados foram processados usando o software FlowJo. A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism Software Versão 8.0 (GraphPadSoftwareInc.).

Para calcular a viabilidade celular após o tratamento, cada amostra foi submetida a contagem de células em contador automático Countess II (Invitrogen) diluído em partes iguais de Trypan Blue (#T10282, Invitrogen) e os dados foram analisados em GraphPad Prism Software Versão 8.0 (GraphPadSoftwareInc.).

As amostras também foram adicionadas em cultura de A549 em placa de 24 poços com lamínulas para microscopia confocal e analisadas em Microscópio Zeiss (LSM780) com lentes de 20X e analisadas com Zeiss Blue 3.8 Software.

3.3.5. Estudo da inibição da adesão bacteriana nas células pulmonares.

Um pré-inóculo das bactérias foi cultivado overnight a 37 °C e no dia seguinte, o inóculo foi preparado e cultivado até atingir $OD_{600} = 0.1$. As células foram lavadas com PBS 1X e coradas com 10 µg/mL de fluoróforo isotiocianato (FITC, #F7250, Sigma-Aldrich) diluído em DMSO anidro sob agitação por 2 horas a 37 °C. Células A549 foram adicionadas em placas de 24 poços contendo lamínulas para microscopia confocal a uma concentração de 1×10^5 células por poço e incubadas por 24 horas a 37 °C.

Primeiramente, em um **regime competitivo**, as OM-NCs (1×10^9 partículas/mL) e a bactéria (concentrações variando entre 0.25×10^5 e 4×10^5 UFC/mL) foram adicionadas à cultura de A549 simultaneamente e incubadas por 90 minutos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Três lavagens com PBS 1X foram realizadas para remover as partes não ligadas e, em seguida, as amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente com paraformaldeído (PFA) 4%. Após 3 lavagens com PBS 1X, as amostras foram incubadas por 40 minutos com fluoróforo azul Hoechst (#33342, ThermoScientific) a 2 µg/mL. Em seguida, as lâminas foram montadas e as amostras foram então examinadas por microscopia confocal de fluorescência.

Em outro experimento paralelo, em **regime de pré-incubação**, as OM-NCs (1×10^9 partículas/mL) foram adicionadas primeiramente à cultura de A549 e incubadas por 90 minutos a 37 °C. Em seguida, a suspensão bacteriana foi adicionada, variando concentrações entre $0,25 \times 10^5$ a 4×10^5 e incubadas por mais 90 minutos a 37 °C. Três lavagens com PBS 1X foram realizadas para remover as partes não ligadas e, em seguida, as amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente com paraformaldeído (PFA) 4%. Após 3 lavagens com PBS 1X, as amostras foram incubadas por 40 minutos com fluoróforo azul Hoechst (#33342, ThermoScientific) a 2 µg/mL. Em seguida, as lâminas foram montadas e as amostras foram então examinadas por microscopia confocal de fluorescência.

Além disso, para entender melhor a habilidade de anti-adesão das OM-NCs em relação às bactérias, analisamos a relação entre a dosagem de OM-NC e a adesão bacteriana. No **regime de pré-incubação**, as concentrações de OM-NCs variaram entre 1×10^7 e 1×10^{10} partículas/mL, seguida pela adição de uma concentração fixa de bactéria (1×10^5 UFC/mL) para um teste de ligação. A quantidade de bactérias ligadas nas células pulmonares com o tratamento prévio das OM-NCs é medida por microscopia de fluorescência. No **regime competitivo**, as bactérias (1×10^5 UFC/mL) foram misturadas

com diferentes concentrações de OM-NCs, variando entre 1×10^7 e 1×10^{10} partículas/mL e então adicionadas à cultura de A549 simultaneamente.

Para verificar se adesinas presentes na OM-NP são capazes de destacar a bactéria previamente ligada às células pulmonares e permitir sua dissociação, no **regime de destacamento**, as bactérias (1×10^5 UFC/mL) coradas (FITC) foram previamente incubadas com A549 (1×10^5 células/mL). Após remover as bactérias não ligadas, uma concentração em partículas mL^{-1} das OM-NCs é adicionada à cultura. No controle, apenas PBS 1X é adicionado. O teste do efeito da concentração e do tempo de incubação de OM-NC na dissociação das bactérias é realizado variando a concentração de OM-NC. A porcentagem de microrganismos remanescentes na cultura de A549 foi analisada após 6, 12, 18 e 24 horas, através da intensidade de fluorescência da ligação. Assim, será possível traçar uma curva de dissociação (%) versus tempo de incubação.

Todas as imagens foram obtidas em Microscópio Confocal de Fluorescência Zeiss (LSM780) com lentes de 20X e analisadas com Zeiss Blue 3.8 Software em três canais de detecção diferentes, para Rhodamina B, FITC e Hoechst e mantendo os mesmos parâmetros para todas as amostras analisadas.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Atividade Antimicrobiana – Mínima Concentração Inibitória

A curcumina é um polifenol hidrofóbico, derivado do rizoma da *Curcuma longa* L., pertencente à família *Zingiberaceae* (PATEL et al., 2020). É conhecida por ter ação anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana, sendo capaz de agir contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos através da inibição da replicação do material genético, limitação da mobilidade ou alteração da expressão gênica (SHARIFI et al., 2020; ZHENG et al., 2020). Uma das hipóteses dessa dissertação se refere ao efeito sinérgico da capacidade de anti-adesão do revestimento de nanopartículas com OMVs, através da competição com as adesinas da bactéria parental, com o conhecido efeito antimicrobiano da curcumina.

Após a realização do teste de atividade antimicrobiana, através da técnica de Mínima Concentração Inibitória, os nanocarreadores de curcumina apresentaram baixa atividade bactericida, quando comparado a antibióticos comumente utilizados, como a gentamicina, e à curcumina livre. A taxa máxima de morte atingida pela maior

concentração de nanocarreadores (2 mg/mL de curcumina encapsulada) foi de 49,1%, em função da medida de absorbância da resazurina (Figura 12A). O teste foi repetido com a irradiação de luz azul, uma vez que a curcumina é uma molécula fotossensível, porém o resultado permaneceu similar (Figura 12B). Também foi realizado o acompanhamento do crescimento bacteriano por até 24 horas, na presença dos nanocarreadores de curcumina (Figura 12C). Neste caso, o crescimento bacteriano em cultura contendo nanopartículas foi o mesmo observado nos poços de controle, evidenciando a ausência de atividade antimicrobiana nestes casos.

Além disso, como os nanocarreadores de curcumina apresentam baixas taxas de fluorescência para os demais testes que envolvem este trabalho, decidimos seguir com os testes de internalização por células patogênicas e do hospedeiro, bem como a capacidade de anti-adesão, com os nanocarreadores de Rhodamina B.

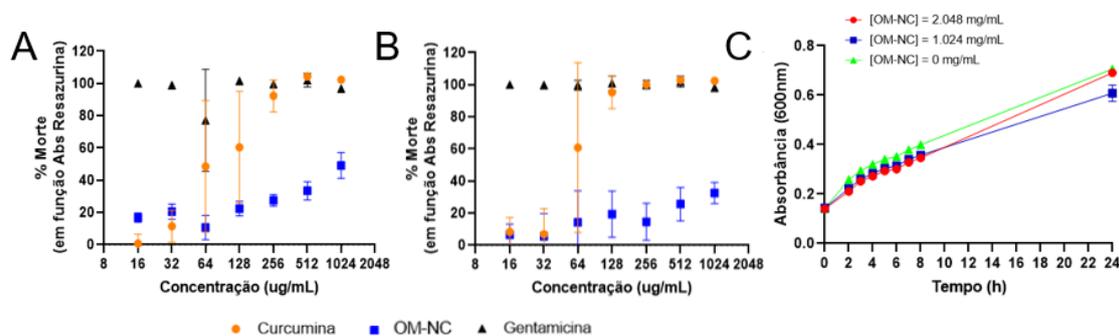
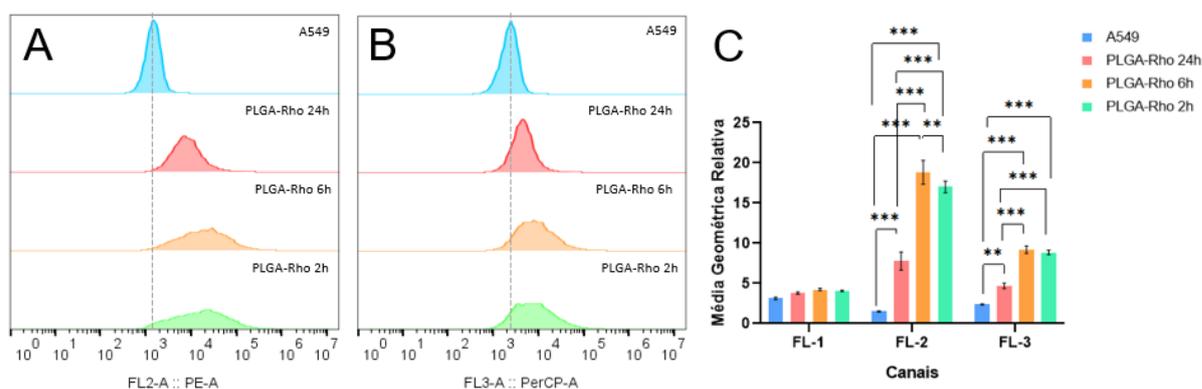


Figura 12. Atividade antimicrobiana de OM-NCs carregadas com Curcumina contra *K. pneumoniae* ATCC 1706 não atinge a mínima concentração inibitória. Na parte superior, os gráficos mostram a porcentagem de morte de *K. pneumoniae* ATCC 1706 das OM-NCs carregadas com Curcumina (azul), comparadas com diferentes concentrações de curcumina livre (laranja) e gentamicina livre (preto) para ensaios (A) sem luz e (B) com luz irradiada. (C) Gráfico representando o ensaio de viabilidade bacteriana ao longo de 24 horas para diferentes concentrações de OM-NC carregadas de Curcumina. Fonte: pela autora.

3.4.2. Internalização em células hospedeiras e bacterianas

Nos ensaios de uptake celular em células hospedeiras, foi testada a capacidade de internalização das nanopartículas sem revestimento (PLGA-Rho) e dos nanocarreadores funcionalizados (OM-NCs) em células do hospedeiro com incubação de 2, 6 e 24 horas. As linhagens escolhidas foram células epiteliais alveolares humanas (A549) e de macrófagos leucêmicos de camundongo (Raw 264.7), visto que são duas linhagens celulares com potencial de interagirem com o patógeno e a nanocápsula terapêutica em um microambiente de infecção pulmonar.

Em relação às PLGA-Rho, foi possível observar uma mudança no perfil celular, alterando os níveis de tamanho e granulosidade das células tratadas. Além disso, também foi possível observar um deslocamento ainda maior nos histogramas de FL-2 e FL-3, podendo indicar que as nanopartículas não revestidas foram internalizadas em células A549 (Figuras 13A e 13B). Já os OM-NCs, as médias geométricas e o deslocamento dos histogramas não apresentaram significância estatística quando comparados às nanopartículas poliméricas e ao controle de células A549, sem tratamento. Devido à diferença significativa de sinal de fluorescência das PLGA-Rho e OM-NCs, esses resultados foram normalizados pela fluorescência das nanopartículas antes do tratamento, como pode ser observado nos gráficos 13C e 13F. Após a normalização, foram obtidas as médias geométricas relativas de cada um dos estágios da nanopartícula, mostrando que de fato as nanopartículas PLGA-Rho apresentam maior sinal nos canais FL-2 e FL-3, principalmente entre 2 e 6 horas de incubação. Entretanto, apesar de os histogramas e as médias geométricas relativas apresentarem baixa relevância estatística, observou-se que os níveis de FSC-A e SSC-A se alteraram no tratamento com OM-NCs entre 2 e 6 horas. Devido às diferenças de fluorescência do nanocarreador antes e, principalmente após o revestimento, os eventos contabilizados neste experimento estão no limite de detecção e não foram suficientes para mostrar a diferença de internalização dos nanocarreadores. Este resultado pode também ocorrer devido ao menor tamanho de PLGA-Rho, que facilita a entrada nas células e também à natureza do revestimento com vesículas bacterianas, que apresenta uma carga superficial menos negativa do que PLGA-Rho, interferindo na interação do nanocarreador com as células hospedeiras. Além disso, também foi avaliada a viabilidade celular após o tratamento, representado no gráfico da Figura 13G. É possível observar que quanto menor o tempo de interação das nanopartículas ou dos nanocarreadores com as células em cultivo, menos elas foram afetadas em relação à viabilidade celular.



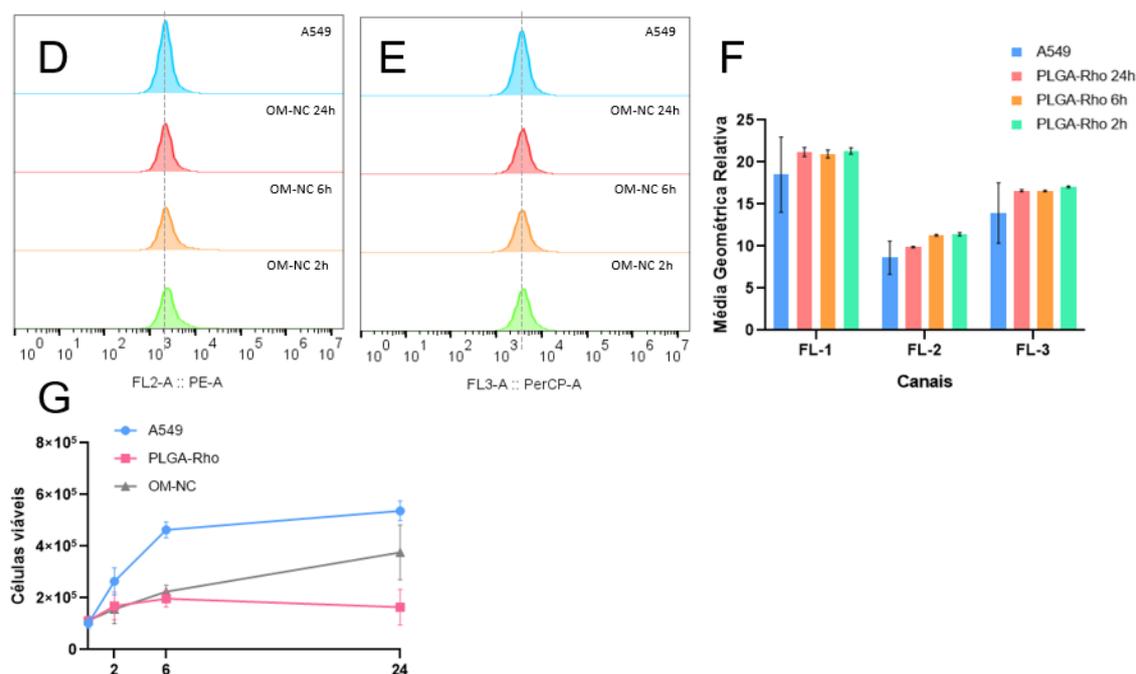


Figura 13. A internalização da nanopartícula revestida apresenta diferenças em comparação com as nanopartículas poliméricas sem revestimento. Histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo para internalização das nanopartículas sem revestimento nos canais (A) FL-2 e (B) FL-3; e para as nanopartículas revestidas (OM-NCs) nos canais (D) FL-2 e (E) FL-3 em células A549 incubadas por 2 (verde), 6 (laranja) e 24 horas (vermelho). Foi adicionado um traço de referência para efeito de comparação. Nos gráficos (C) e (F), estão representadas as médias geométricas relativas da internalização das nanopartículas e dos nanocarreadores, respectivamente, obtidas após a normalização da média geométrica da citometria de fluxo com a medida de fluorescência de PLGA-Rho e OM-NCs nos canais FL-1, FL-2 e FL-3. (G) Gráfico de viabilidade celular calculado por contagem de células após o tratamento das células A549 com PLGA-Rho (em rosa) ou OM-NCs (em cinza). Dados representados por média \pm erro padrão. Dados analisados por análise de variância (ANOVA). Significâncias estão indicadas por ** para P-Value < 0,01; *** para P-Value < 0,001; **** para P-Value < 0,0001. Fonte: pela autora.

De forma similar, a internalização em células de macrófagos ocorre de forma mais significativa quando a incubação é de 2 a 6 horas com PLGA-Rho, apesar da diferença de fluorescência da nanopartícula antes e após o revestimento. No histograma da Figura 14A, é possível observar o deslocamento da curva para a direita das nanopartículas sem revestimento em relação ao controle de Raw 264.7. Já no histograma da Figura 14B, o deslocamento não é estatisticamente relevante, dado mostrado também na Figura 14C, comparando as médias geométricas de ambas internalizações. Neste caso, o menor tamanho das nanopartículas sem revestimento pode facilitar este resultado, uma vez que as células Raw 264.7 são menores do que as A549, além da natureza do revestimento com vesículas bacterianas, que apresenta uma carga superficial menos negativa do que PLGA-Rho, interferindo na interação do nanocarreador com as células hospedeiras. A fluorescência por partícula também interfere ao mostrar a internalização do

nanocarreadores, uma vez que os eventos contabilizados neste experimento estão no limite de detecção e não foram suficientes para mostrar a diferença de internalização dos nanocarreadores.

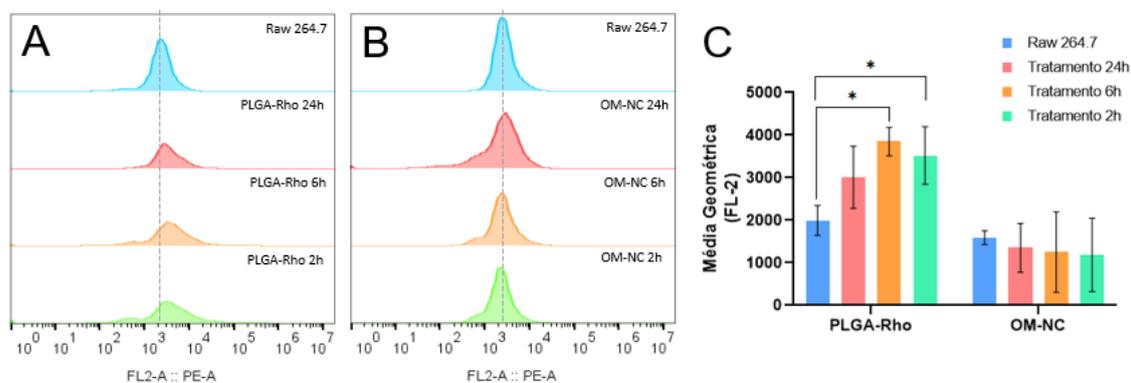


Figura 14. Efeito similar observado na internalização das nanopartículas em relação às células de macrófago Raw 264.7. Histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo para internalização das (A) nanopartículas sem revestimento e (B) para as nanopartículas revestidas (OM-NCs) no canal FL-2 em células Raw 264.7 incubadas por 2 (verde), 6 (laranja) e 24 horas (vermelho). Foi adicionado um traço de referência para efeito de comparação. No gráfico (C), está representada a média geométrica obtida neste canal em relação às PLGA-Rho e OM-NCs. representadas as médias geométricas relativas da internalização das nanopartículas e dos nanocarreadores. Dados representados por média \pm erro padrão. Dados analisados por análise de variância (ANOVA). Significâncias estão indicadas por * para P-Value < 0,05. Fonte: pela autora.

Além da interação com células hospedeiras, realizamos o teste de uptake celular por citometria de fluxo em cepas bacterianas diferentes (Figura 15). As cepas escolhidas foram *Klebsiella pneumoniae*, por ser responsável por casos severos de pneumoniae e também por se tratar da bactéria que dá origem às vesículas de revestimento utilizadas neste trabalho; *Streptococcus pneumoniae*, por se tratar de uma bactéria Gram-positiva e ser a principal causadora de pneumonia adquirida na comunidade (do inglês, CAP) (ALIBERTI et al., 2019); e *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa também responsável por infecções nosocomiais como a pneumonia, especialmente em pacientes imunocomprometidos (REYNOLDS; KOLLEF, 2021). A hipótese, neste caso, é de que os nanocarreadores com vesículas bacterianas de uma cepa Gram-negativa interajam de formas diferentes com bactérias de outras espécies tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas. Em relação às nanopartículas sem revestimento, foi possível observar um maior deslocamento do histograma de FL-2 nas células de *S. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, representados pela curva verde na Figura 15. As médias geométricas neste canal variaram de 1256 para *K. pneumoniae*, 4192 para *S. pneumoniae* e 2271 para *P.*

aeruginosa. Enquanto isso, para os nanocarreadores funcionalizados, o sinal detectado no canal escolhido foi mais baixo do que as nanopartículas não revestidas, uma vez que trabalhamos no limite de detecção da técnica, já que a fluorescência por partícula era menor nestes casos. Outras técnicas, principalmente de imagem, poderiam esclarecer o uptake dos nanocarreadores em células bacterianas.

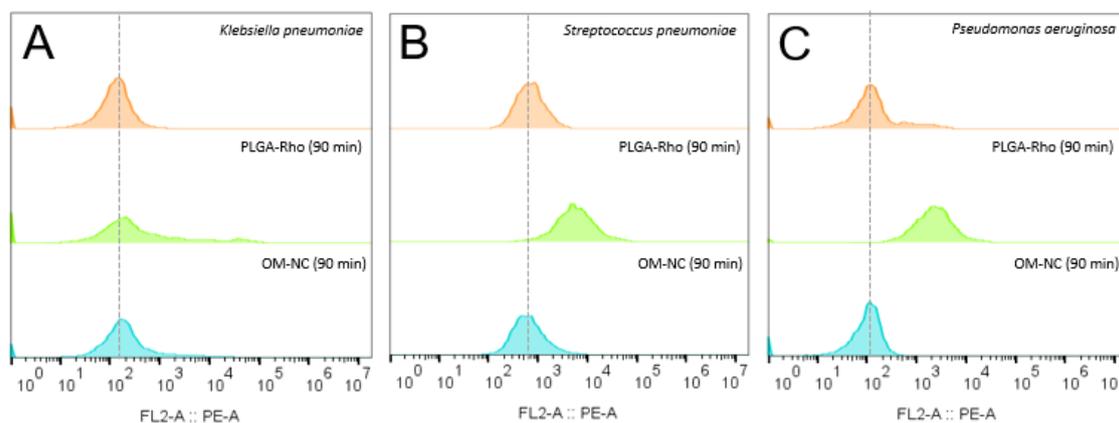


Figura 15. As características de cada espécie bacteriana interferem na internalização das nanopartículas. Histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo para internalização das nanopartículas sem revestimento (PLGA-Rho) e para as nanopartículas revestidas (OM-NCs) no canal FL-2 em incubação por 90 minutos em cepas bacterianas (A) *K. pneumoniae*, (B) *Streptococcus pneumoniae* e (C) *Pseudomonas aeruginosa*. Foi adicionado um traço de referência para efeito de comparação. Fonte: pela autora.

3.4.3. Estudo da inibição da adesão bacteriana nas células pulmonares

Depois de caracterizar a ligação de OM-NCs com as células hospedeiras, estudou-se a inibição da adesão de *K. pneumoniae* com as OM-NCs em três regimes diferentes de incubação (Figura 16).

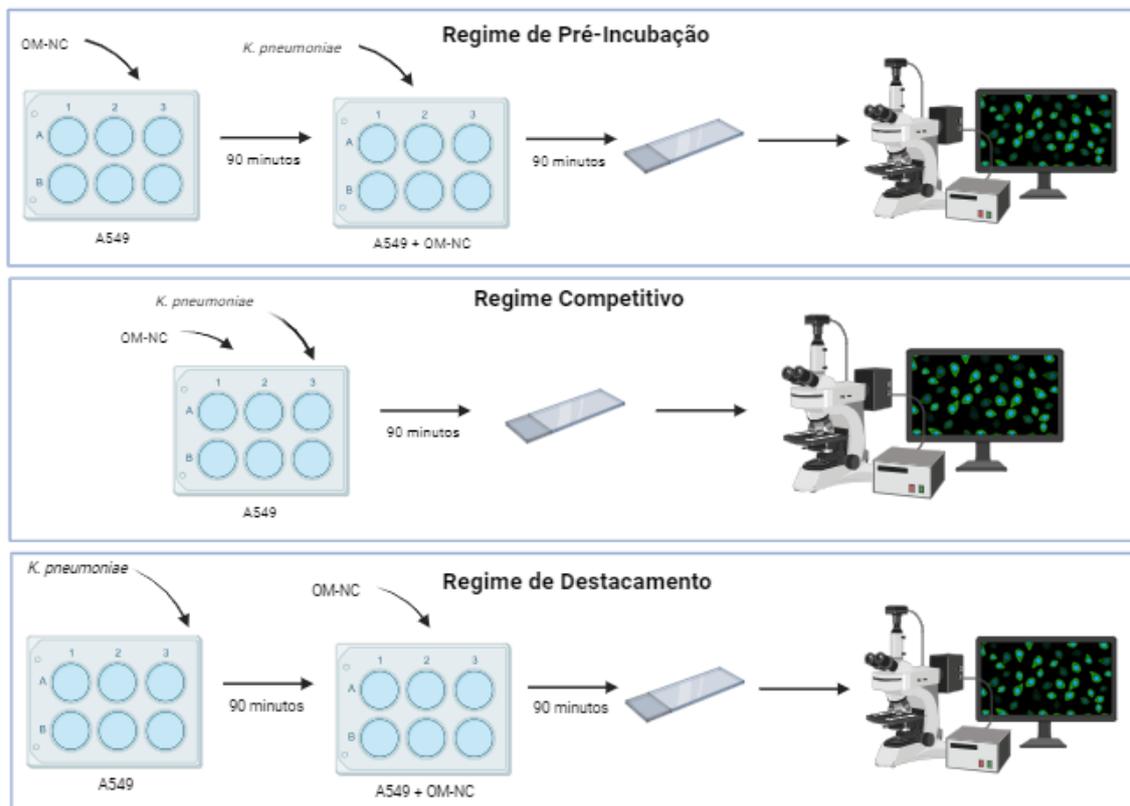
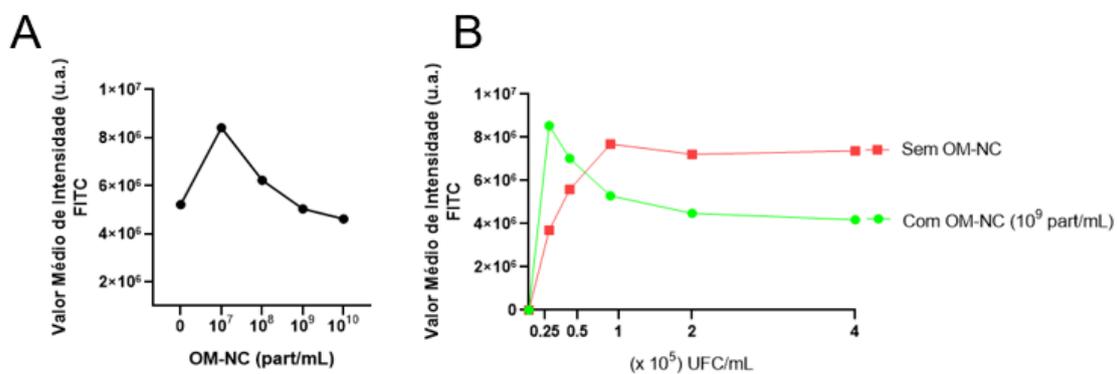
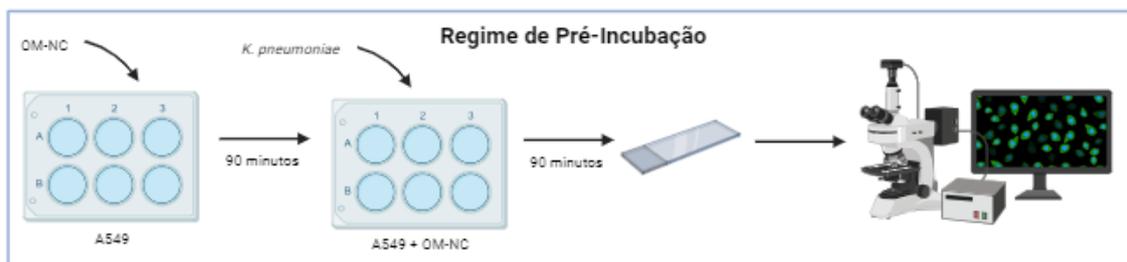


Figura 16. Representação esquemática dos regimes de incubação utilizados nos testes anti-adesão para análise em Microscopia Confocal de Fluorescência. No Regime de Pré-Incubação, as OM-NCs foram adicionadas à cultura de células A549 antes do input bacteriano. No Regime Competitivo, os dois sistemas foram adicionados simultaneamente à cultura de células pulmonares. E por fim, no Regime Competitivo, o cultivo bacteriano foi acrescido antes da adição dos nanocarreadores terapêuticos. Após os tratamentos, os sistemas foram montados em lâminas e analisadas em microscópio confocal.

No Regime de Pré-Incubação, as OM-NCs foram adicionadas à cultura de A549 e incubadas por 90 minutos. Após essa interação, as bactérias (1×10^5 UFC/mL) foram adicionadas e incubadas por mais 90 minutos. Ao final do tratamento, depois de remover as bactérias não ligadas na solução, as amostras foram examinadas com microscopia de fluorescência. Foi observado um efeito anti-adesão das OM-NCs, uma vez que a quantidade de *K. pneumoniae* ligada, medida pela Intensidade Média de Fluorescência do corante FITC, diminuiu com o aumento da concentração de OM-NCs, a partir da concentração de 1×10^7 partículas/mL (Figura 17A). Foram obtidas imagens Microscópio Confocal de Fluorescência em três canais diferentes, para detectar a Rhodamina B, o FITC e o Hoechst e estão representadas na Figura 16C. Para uma análise quantitativa, variamos a entrada de *K. pneumoniae* de 0,25 a 4×10^5 UFC/mL e comparamos a intensidade de fluorescência de FITC com o tratamento de 1×10^9 partículas/mL ou sem (Figura 17B). Em ambos os grupos, a quantidade de *K. pneumoniae* ligada aumentou

inicialmente à medida que a entrada bacteriana foi aumentada e depois diminuiu e se estabilizou, o que pode indicar uma propriedade anti-adesão neste caso. A figura 17D mostra as imagens obtidas em Microscópio Confocal comparando o efeito do tratamento com 1×10^9 part/mL de OM-NCs contra 2×10^5 UFC/mL incubadas com A549.



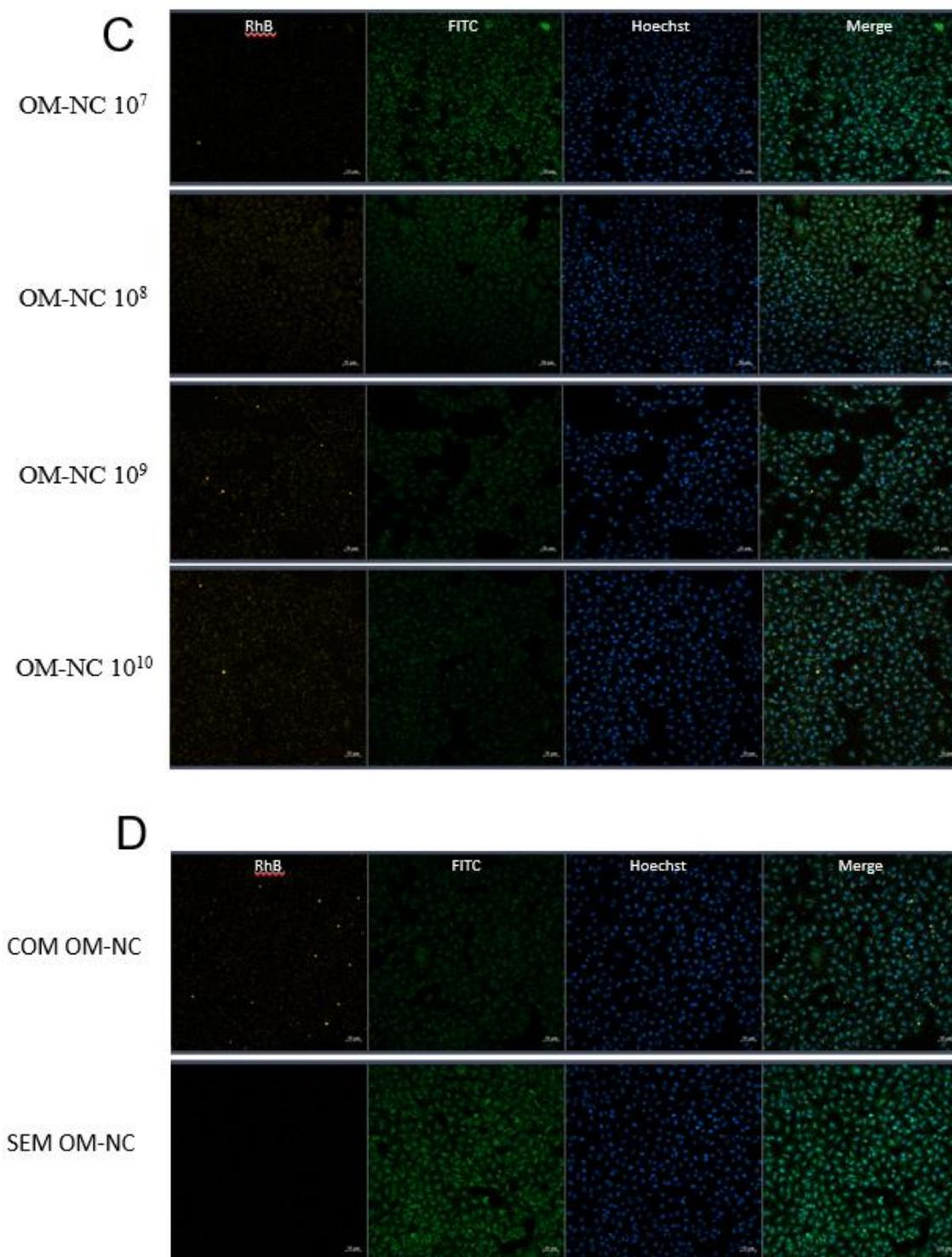
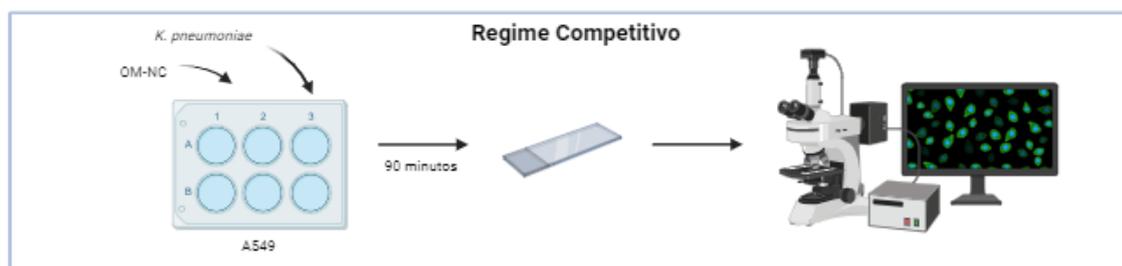


Figura 17. Em Regime de Pré-Incubação, os nanocarreadores indicam ação preventiva à adesão das células bacterianas em A549. Valores Médios de Intensidade de FITC, usado aqui como marcador das células bacterianas, medidos em Microscópio Confocal de Fluorescência. *K. pneumoniae* ATCC 1706 (1×10^5 UFC/mL) foi incubada após 90 minutos de interação entre células A549 (1×10^5 células/mL) e OM-NCs, (A) variando a concentração em dose-dependência, e (B) fixada a concentração de 1×10^9 part/mL para diferentes concentrações de bactéria. Não houve relevância estatística entre os dados. (C) Imagens de Microscopia Confocal comparando (C) os testes de dose-dependência de OM-NCs e (D) os resultados obtidos do tratamento com OM-NCs para uma concentração de 2×10^5 UFC/mL de *K. pneumoniae*. Fonte: pela autora.

Também testamos a ligação em um Regime Competitivo, onde a bactéria *K. pneumoniae* foi misturada primeiro com OM-NCs seguida pela adição da mistura às células A549 plaqueadas. Para analisar quantitativamente os efeitos da dosagem de OM-NCs e da sequência de dosagem, a intensidade de fluorescência medida a partir do *K. pneumoniae* ligada foi plotada em relação à concentração de OM-NCs que variou (Figura 18A). Neste regime, a ligação de *K. pneumoniae* também diminuiu enquanto a concentração de OM-NCs foi aumentada. No entanto, menos *K. pneumoniae* foram encontradas para ligar com células A549 do que aqueles no Regime de Pré-Incubação, sugerindo uma maior eficácia anti-adesão no Regime Competitivo. Comparando na mesma concentração de entrada de nanocarreadores, a intensidade de fluorescência do marcador bacteriano foi menor no Regime Competitivo do que no Regime de Pré-Incubação. Em relação à variação da entrada de células bacterianas, o resultado após o tratamento com as OM-NCs em Regime Competitivo foi similar ao obtido no Regime de Pré-Incubação, com aumento da intensidade da fluorescência seguido de queda e estabilização (Figura 18B). Isso indica que apesar do aumento da quantidade de células bacterianas no sistema, a concentração fixa de 1×10^9 part/mL de OM-NCs foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, representado pela intensidade de fluorescência do marcador. Foram obtidas imagens Microscópio Confocal de Fluorescência em três canais diferentes, para detectar a Rhodamina B, o FITC e o Hoechst e estão representadas na Figura 18C. A Figura 18D mostra as imagens obtidas comparando o efeito do tratamento com 1×10^9 part/mL de OM-NCs contra 2×10^5 UFC/mL incubadas com A549.



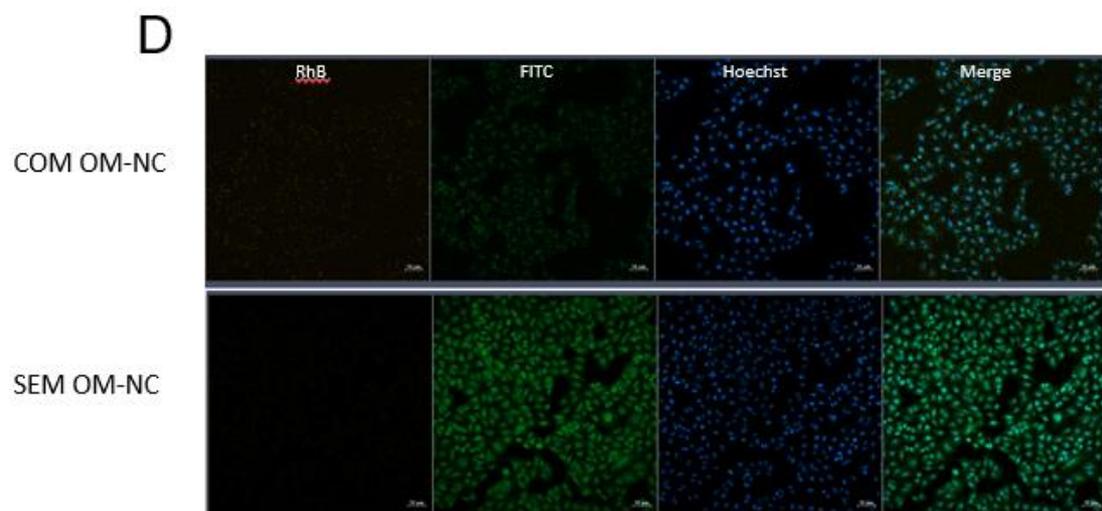
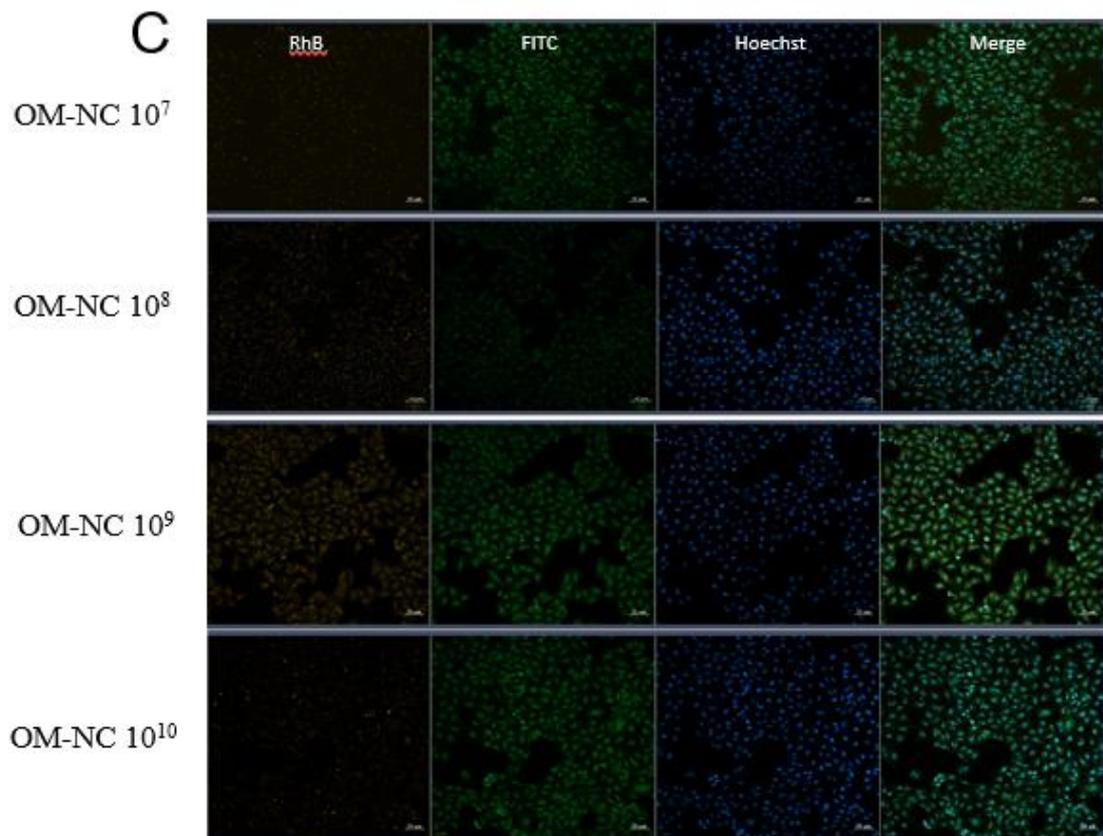
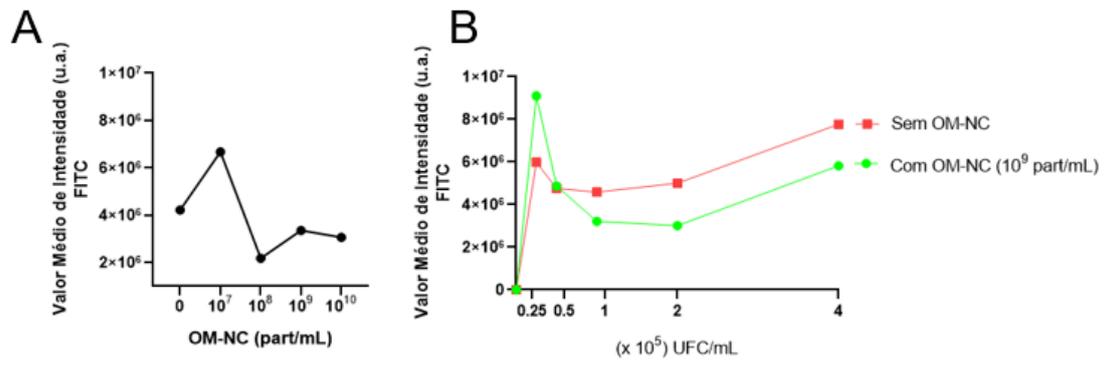


Figura 18. O tratamento das células A549 com OM-NC em Regime Competitivo tem efeitos apesar do aumento da concentração bacteriana. Valores Médios de Intensidade de FITC, usado aqui como marcador das células bacterianas, medidos em Microscópio Confocal de Fluorescência após incubação por 90 minutos de células A549 (1×10^5 células/mL) com *K. pneumoniae* ATCC 1706 (1×10^5 UFC/mL) e OM-NCs ao mesmo tempo, (A) variando a concentração em dose-dependência, e (B) fixada a concentração de 1×10^9 part/mL para diferentes concentrações de bactéria. Não houve relevância estatística entre os dados. Dados representados pela média. (C) Imagens de Microscopia Confocal comparando (C) os testes de dose-dependência de OM-NCs e (D) os resultados obtidos do tratamento com OM-NCs para uma concentração de 2×10^5 UFC/mL de *K. pneumoniae*. Fonte: pela autora

Por fim, para testar se as adesinas presentes nas OM-NCs seriam capazes de dissociar a *K. pneumoniae* previamente ligada às células A549, incubamos as duas linhagens celulares por 90 minutos. Após a remoção das bactérias não ligadas, 1×10^9 partículas/mL de OM-NCs foram adicionadas às células. As amostras de controle foram adicionadas apenas com PBS. As amostras foram incubadas por 15, 30, 60 e 90 minutos e depois lavadas antes do estudo microscópico de fluorescência. No Regime de Destacamento, não houve um padrão, nem relevância estatística na diferença de intensidade de fluoróforo (Figura 19). Isso indica que as OM-NCs provavelmente não foram capazes de dissociar a ligação entre bactéria e A549 nos tempos determinados. Mais estudos de caracterização das adesinas e com maiores tempos de incubação são necessários para esclarecer este resultado.

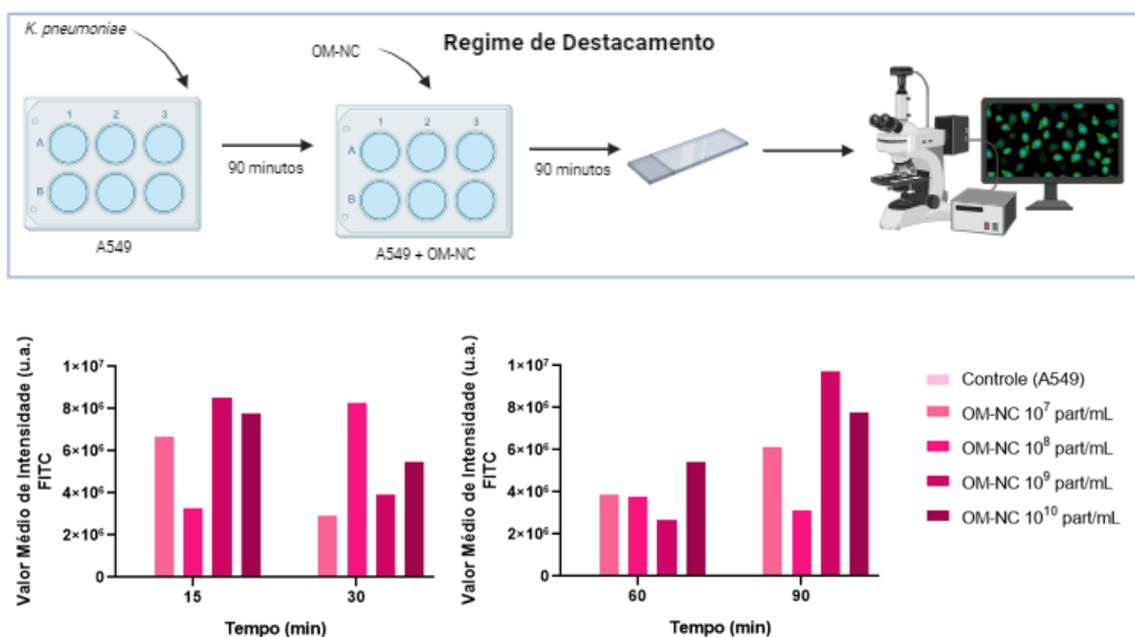


Figura 19. Os nanocarreadores não apresentaram efeito de destacamento na adesão bacteriana no intervalo de 15 a 90 minutos. Valores Médios de Intensidade de FITC, usado aqui como marcador das células bacterianas, medidos em Microscópio Confocal de Fluorescência. Após interação das células A549 (1×10^5 células/mL) e *K. pneumoniae* ATCC 1706 (1×10^5 UFC/mL) por 90 minutos, as OM-NCs (1×10^9 part/mL)

foram incubadas por 15, 30, 60 e 90 minutos e não houve significância estatística na diminuição dos valores de fluorescência da bactéria. Fonte: pela autora.

3.5. Conclusão

Exploramos a hipótese do efeito sinérgico do revestimento de nanopartículas com OMVs, competindo com as adesinas da bactéria parental, juntamente com o conhecido efeito antimicrobiano da curcumina. Após os testes, o grupo decidiu seguir os demais testes *in vitro* com os nanocarreadores de Rhodamina, uma vez que os nanocarreadores de curcumina apresentaram baixa atividade bactericida em testes de concentração inibitória mínima, em comparação com antibióticos comuns.

Além disso, avaliou-se a capacidade de internalização de nanopartículas sem revestimento (PLGA-Rho) e de nanocarreadores funcionalizados (OM-NCs) em células do hospedeiro com incubação de 2, 6 e 24 horas. As células escolhidas foram A549 e Raw 264.7, relevantes para o microambiente de infecção pulmonar. As PLGA-Rho mostraram maior internalização nas células A549, indicando sua capacidade de penetração. Já os OM-NCs não apresentaram significância estatística em relação às nanopartículas poliméricas e ao controle de células A549. Apesar disso, foram observadas alterações nos níveis de FSC-A e SSC-A, o que pode indicar interação dos nanocarreadores com as células hospedeiras. A viabilidade celular não foi alterada com poucas horas de interação com as nanopartículas e os nanocarreadores.

Por fim, avaliou-se a capacidade das nanopartículas funcionalizadas de inibir a adesão de *K. pneumoniae* em células A549. No Regime de Pré-Incubação, observou-se uma diminuição da quantidade de *K. pneumoniae* ligada com o aumento da concentração de OM-NCs. No Regime Competitivo, também foi observada uma redução na adesão bacteriana, indicando a eficácia anti-adesão das OM-NCs. No entanto, no Regime de Destacamento, não foram observados resultados conclusivos sobre a capacidade das adesinas presentes nas OM-NCs em dissociar a ligação entre a bactéria e as células A549. Mais estudos são necessários para esclarecer este resultado.

CONCLUSÕES GERAIS

A resistência antimicrobiana é uma grande ameaça global à saúde e a busca por alternativas viáveis para combater microrganismos multirresistentes tem aumentado, com enfoque em compostos naturais e nanomateriais, destacando-se o uso de vesículas bacterianas de membrana externa (OMVs). Essas estruturas podem modular o sistema imunológico do hospedeiro e competir com patógenos, sendo consideradas seguras e eficazes em diferentes abordagens biomédicas para o tratamento de doenças infecciosas.

No **Capítulo 1**, a caracterização das OMVs secretadas pelas cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 e A54970 revelou informações importantes sobre sua quantidade, tamanho, composição proteica e propriedades físicas. A análise indicou que as OMVs apresentam uma morfologia esférica e uma carga de superfície negativa. As condições de cultivo bacteriano, incluindo a fase de crescimento e o meio de cultura, desempenham um papel crítico na produção e nas características das vesículas.

No **Capítulo 2**, a técnica de nanoprecipitação permitiu a síntese bem-sucedida de nanopartículas de PLGA carregadas com Curcumina e Rhodamina B, com propriedades físico-químicas adequadas para aplicações terapêuticas. A funcionalização das OMVs com essas nanopartículas também foi realizada com sucesso, ampliando seu potencial de aplicação em terapias biomédicas.

Por fim, no **Capítulo 3**, investigou-se o efeito sinérgico do revestimento de nanopartículas com OMVs e o potencial antimicrobiano da curcumina. Os nanocarreadores de curcumina mostraram baixa atividade bactericida e pouca fluorescência em testes subsequentes. Em vez disso, os nanocarreadores de Rhodamina B foram enfatizados, evidenciando sua internalização em células A549 e sua capacidade de anti-adesão. Além disso, nossos resultados preveem uma capacidade anti-adesão em duas abordagens, uma vez que reduziu a adesão de *K. pneumoniae* em células pulmonares.

Esses resultados contribuem para o conhecimento sobre as OMVs e sua potencial aplicação em aplicações médicas, como vacinas e terapias. Estudos anteriores destacaram o potencial terapêutico tanto das nanopartículas quanto das OMVs, devido às suas propriedades imunomoduladoras e capacidade de transporte de moléculas bioativas. Essa combinação representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de sistemas de

liberação de fármacos e terapias avançadas. Estudos adicionais são necessários para avaliar a eficácia e segurança desses sistemas antes de sua aplicação clínica.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBERTI, S. et al. International prevalence and risk factors evaluation for drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. **Journal of Infection**, v. 79, n. 4, p. 300–311, 1 out. 2019.
- ALLAHYARI, M. **PLGA Nanoparticles as an Efficient Platform in Protein Vaccines Against *Toxoplasma gondii***. **Acta Parasitologica**. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 jun. 2022.
- ASADI, A. et al. **A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases**. **Infection**. Urban und Vogel GmbH, 7 fev. 2019.
- ASSEFA, M. Multi-drug resistant gram-negative bacterial pneumonia: etiology, risk factors, and drug resistance patterns. **Pneumonia**, v. 14, n. 1, 5 maio 2022.
- BALDERRAMA-GONZÁLEZ, A. S. et al. **Antimicrobial resistance and inorganic nanoparticles**. **International Journal of Molecular Science**. SMDPI, 1 dez. 2021.
- BARNES, M. D. et al. Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-2 (KPC-2), Substitutions at Ambler Position Asp179, and Resistance to Ceftazidime-Avibactam: Unique Antibiotic-Resistant Phenotypes Emerge from Lactamase Protein Engineering. 2017.
- BASSETTI, M. et al. New antibiotics for Gram-negative pneumonia. **European Respiratory Review**, v. 31, n. 166, 1 dez. 2022.
- BHAR, S.; EDELMANN, M. J.; JONES, M. K. Characterization and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a commensal microbe, *Enterobacter cloacae*. **Journal of Proteomics**, v. 231, 16 jan. 2021.
- BISHT, D.; MEENA, L. **Adhesion molecules facilitate host-pathogen interaction and mediate *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis**. **Indian Journal of Medical Research**. Wolters Kluwer Medknow Publications, , 1 jul. 2019.
- BYVALOV, A. A. et al. Yersinia outer membrane vesicles as potential vaccine candidates in protecting against plague. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1–23, 2020.
- CAÑAS, M. A. et al. Outer membrane vesicles from probiotic and commensal *Escherichia coli* activate NOD1-mediated immune responses in intestinal epithelial cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, 20 mar. 2018.
- CARUANA, J. C.; WALPER, S. A. **Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions**. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A., , 24 mar. 2020.
- CHEN, F. et al. Molecular analysis of curcumin-induced polarization of murine RAW264.7 macrophages. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 544–552, 2014.
- CHO, H. J. et al. Different macrophage polarization between pulmonary tuberculosis. p. 1–10, 2020.
- CILLÓNIZ, C.; DOMINEDÒ, C.; TORRES, A. Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. **Critical Care**, v. 23, n. 79, 2019.
- CLSI. Reference method for broth dilution. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3th ed.**, v. 28, n. 14, p. 0–13, 2008.

- COFRÉ, J. et al. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento antimicrobiano de la neumonía bacteriana adquirida en la comunidad en pediatría. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 4, p. 505–512, 2019.
- COOKE, A. C. et al. Pseudomonas Quinolone Signal-Induced Outer Membrane Vesicles Enhance Biofilm Dispersion in Pseudomonas aeruginosa . **mSphere**, v. 5, n. 6, 23 dez. 2020.
- CRAPARO, E. F. et al. Mpeg-plga nanoparticles labelled with loaded or conjugated rhodamine-b for potential nose-to-brain delivery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.
- DAI, P.; HU, D. **The making of hypervirulent Klebsiella pneumoniae**. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. John Wiley and Sons Inc, , 1 dez. 2022.
- DE JONGE, E. F. et al. Heat shock enhances outer-membrane vesicle release in Bordetella spp. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, 1 dez. 2021.
- DELL'ANNUNZIATA, F. et al. Outer membrane vesicles derived from klebsiella pneumoniae are a driving force for horizontal gene transfer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.
- DESAI, N. et al. “Bioinspired” Membrane-Coated Nanosystems in Cancer Theranostics: A Comprehensive Review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 1677, 8 jun. 2023.
- DIEP, Y. N. et al. Nanomedicine for advanced cancer immunotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 1017–1037, nov. 2022.
- ELMOWAFY, M. et al. **Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges**. **Polymers**. MDPI, , 1 mar. 2023.
- FANG, R. H. et al. **Cell Membrane Coating Nanotechnology**. **Advanced Materials**. Wiley-VCH Verlag, , 6 jun. 2018.
- FANG, R. H.; GAO, W.; ZHANG, L. **Targeting drugs to tumours using cell membrane-coated nanoparticles**. **Nature Reviews Clinical Oncology**. Springer Nature, , 1 jan. 2023.
- FELTRIN, F. DA S. et al. Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: A promising strategy for cancer therapies. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 300, p. 102582, 1 fev. 2022.
- GAO, M. et al. **Enhanced curcumin solubility and antibacterial activity by encapsulation in PLGA oily core nanocapsules**. **Food and Function**. **Anais...Royal Society of Chemistry**, 1 jan. 2020.
- GAO, S. et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 85, n. 2014, p. 131–139, 2015.
- GASPERINI, G. et al. Physiopathological roles of spontaneously released outer membrane vesicles of Bordetella pertussis. **Future Microbiology**, v. 12, n. 14, p. 1247–1259, 1 nov. 2017.
- GERRITZEN, M. J. H.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H. PT NU SC. **Biotechnology Advances**, 2017.
- GIORDANO, N. P.; CIAN, M. B.; DALEBROUX, Z. D. Outer membrane lipid secretion and the innate immune response to gram-negative bacteria. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 7, p. 1–21, 2020.
- GOWD, V. et al. Advancement of cancer immunotherapy using nanoparticles-based nanomedicine. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, n. 2, p. 624–644, nov. 2022.

- GUO, X. et al. PLGA-based Micro/Nanoparticles: An Overview of Their Applications in Respiratory Diseases. **Int. J. Mol. Sci**, p. 24, 2023.
- HADADI-FISHANI, M. et al. **Isolation and immunogenicity of extracted outer membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa under antibiotics treatment conditions**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir>>.
- HAN, F. et al. **Outer membrane vesicles from bacteria: Role and potential value in the pathogenesis of chronic respiratory diseases**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Media S.A., , 8 dez. 2022.
- HENRY J. WINDLE. **Isolation of Outer Membrane Vesicles from Helicobacter pylori**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>.
- HOLMES, C. L. et al. Pathogenesis of Gram-Negative Bacteremia. 2021.
- IVÁN MARTÍNEZ-MUÑOZ, O.; ELIZABETH MORA-HUERTAS, C. Nanoprecipitation technology to prepare carrier systems of interest in pharmaceuticals: An overview of patenting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 614, p. 121440, 25 fev. 2022.
- IZUI, S. et al. Inhibitory effects of curcumin against cytotoxicity of Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles. **Archives of Oral Biology**, v. 124, 1 abr. 2021.
- JAN, A. T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: A perspective update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, 9 jun. 2017.
- JASIM, R. et al. Lipidomic analysis of the outer membrane vesicles from paired polymyxin-susceptible and -resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 10 ago. 2018.
- JOSSE, J.; LAURENT, F.; DIOT, A. **Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms**. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A., , 5 dez. 2017.
- KAPARAKIS-LIASKOS, M.; KUFER, T. A. **Bacterial Membrane Vesicles: Biogenesis, Functions and Applications**. [s.l.] Springer International Publishing, 2020.
- KIM, J. Y. et al. Gram-Negative Bacteria's Outer Membrane Vesicles. **Infection & Chemotherapy**, v. 55, 2023a.
- KIM, J. Y. et al. Gram-Negative Bacteria's Outer Membrane Vesicles. **Infection & Chemotherapy**, v. 55, 2023b.
- KLIMENTOVA, J. et al. Francisella tularensis subsp. holarctica Releases Differentially Loaded Outer Membrane Vesicles Under Various Stress Conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 10 out. 2019.
- KUERBAN, K. et al. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 8, p. 1534–1548, 2020.
- LANKS, C. W.; MUSANI, A. I.; HSIA, D. W. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 3, p. 487–501, 2019.
- LI, A.; SCHERTZER, J. W.; YONG, X. Molecular conformation affects the interaction of the Pseudomonas quinolone signal with the bacterial outer membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 4, p. 1089–1094, 2019a.

- LI, A.; SCHERTZER, J. W.; YONG, X. Molecular conformation affects the interaction of the Pseudomonas quinolone signal with the bacterial outer membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 4, p. 1089–1094, 25 jan. 2019b.
- LI, D. et al. **Klebsiella pneumoniae bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Media S.A., , 2023.
- LI, M. et al. Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. **Journal of Controlled Release**, v. 323, n. December 2019, p. 253–268, 2020.
- LI, Y. et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10340, p. 2047–2064, 28 maio 2022.
- LIEBERMAN, L. A. **Outer membrane vesicles: A bacterial-derived vaccination system**. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A., , 21 dez. 2022.
- LIN, J. et al. A Pseudomonas T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. **Nature Communications**, v. 8, 28 mar. 2017.
- LIN, J. et al. **The Pseudomonas quinolone signal (PQS): Not just for quorum sensing anymore**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Media S.A., , 4 jul. 2018.
- LIU, L. et al. Systematic design of cell membrane coating to improve tumor targeting of nanoparticles. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.
- LIU, W.; HUANG, Y. **Cell membrane-engineered nanoparticles for cancer therapy**. **Journal of Materials Chemistry B** Royal Society of Chemistry, , 26 maio 2022.
- MANCINI, F. et al. OMV vaccines and the role of TLR agonists in immune response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–19, 2020.
- MANDELL, L. A.; NIEDERMAN, M. S. Aspiration pneumonia. **The New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 7, p. 651–663, 2019.
- MARCHANT, P. et al. “One for All”: Functional Transfer of OMV-Mediated Polymyxin B Resistance From Salmonella enterica sv. Typhi Δ tolR and Δ degS to Susceptible Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 5 maio 2021.
- MARTORA, F. et al. Isolation, characterization and analysis of pro-inflammatory potential of Klebsiella pneumoniae outer membrane vesicles. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, 1 nov. 2019.
- MCCAIG, W. D.; KOLLER, A.; THANASSI, D. G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by Francisella novicida. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 6, p. 1120–1132, mar. 2013.
- MITCHISON-FIELD, L. M.; BELIN, B. J. **Bacterial lipid biophysics and membrane organization**. **Current Opinion in Microbiology** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2023.
- MOHABATI MOBAREZ, A. et al. **A novel method for the extraction of outer membrane vesicles (OMVs) from Bordetella pertussis Tohama strain**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir>>.
- MOHAMMADI, A. et al. **Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent**. [s.l.] Elsevier Inc, 2019. v. 66

MOLINA-TIJERAS, J. A.; GÁLVEZ, J.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E. **The immunomodulatory properties of extracellular vesicles derived from probiotics: A novel approach for the management of gastrointestinal diseases.** *Nutrients*. MDPI AG, , 1 maio 2019.

NANDAKUMAR, V. et al. Differential macrophage polarization from Pneumocystis in immunocompetent and immunosuppressed hosts: Potential adjunctive therapy during pneumonia. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 3, p. 1–21, 2017.

NGUYEN, A. H. et al. **Bacterial cell membranes and their role in daptomycin resistance: A review.** *Frontiers in Molecular Biosciences* Frontiers Media S.A., 14 nov. 2022.

ORENCH-RIVERA, N.; KUEHN, M. J. **Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export.** *Cellular Microbiology* Blackwell Publishing Ltd, 1 nov. 2016.

ORENCH-RIVERA, N.; KUEHN, M. J. Differential Packaging Into Outer Membrane Vesicles Upon Oxidative Stress Reveals a General Mechanism for Cargo Selectivity. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2 jul. 2021.

PATEL, S. S. et al. **Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc., , 25 mar. 2020.

PATHIRANA, R. D.; KAPARAKIS-LIASKOS, M. Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 18, n. 11, p. 1518–1524, 2016.

PRABHURAJ, R. S. et al. Selection of superior targeting ligands using PEGylated PLGA nanoparticles for delivery of curcumin in the treatment of triple-negative breast cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 57, 1 jun. 2020.

QING, G. et al. Natural and engineered bacterial outer membrane vesicles. *Biophysics Reports*, v. 5, n. 4, p. 184–198, ago. 2019.

REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. **The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update.** *Drugs*. Adis, , 1 dez. 2021.

RUSSO, T. A.; MARR, C. M. **Hypervirulent Klebsiella pneumoniae.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://doi.org/10>>.

SCHETTERS, S. T. T. et al. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8+ T cells. *Acta Biomaterialia*, v. 91, p. 248–257, 2019.

SEDAGHAT, M. et al. **Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of Vibrio cholerae O1 El Tor in immunized mice.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir>>.

SHARIF, E.; EFTEKHARI, Z.; MOHIT, E. The Effect of Growth Stage and Isolation Method on Properties of ClearColi™ Outer Membrane Vesicles (OMVs). *Current Microbiology*, v. 78, n. 4, p. 1602–1614, 1 abr. 2021.

SHARIFI, S. et al. **Anti-microbial activity of curcumin nanoformulations: New trends and future perspectives.** *Phytotherapy Research* John Wiley and Sons Ltd, , 1 ago. 2020.

SHEHATA, M. M. et al. Bacterial outer membrane vesicles (OMVs)-based dual vaccine for influenza a H1N1 virus and MERS-CoV. *Vaccines*, v. 7, n. 2, p. 1–13, 2019.

- SHEN, X. et al. PLGA-Based Drug Delivery Systems for Remotely Triggered Cancer Therapeutic and Diagnostic Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. May, p. 1–19, 2020.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados - Parte II. **Polimeros**, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.
- STEVENSON, T. C. et al. Immunization with outer membrane vesicles displaying conserved surface polysaccharide antigen elicits broadly antimicrobial antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 14, p. E3106–E3115, 2018.
- STOJOWSKA-SWĘDRZYŃSKA, K. et al. **Antibiotic heteroresistance in Klebsiella pneumoniae**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 jan. 2022.
- TASHIRO, Y. et al. Pseudomonas quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. **Microbes and Environments**, v. 25, n. 2, p. 120–125, 2010a.
- TASHIRO, Y. et al. Variation of physiochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in Pseudomonas aeruginosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3732–3739, jun. 2010b.
- THIRIOT, J. D. et al. Hacking the host: Exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 1, p. 1–14, 2020.
- TOYOFUKU, M. et al. Composition and functions of bacterial membrane vesicles. **Nature Reviews Microbiology**, 17 mar. 2023.
- TURNER, L. et al. Helicobacter pylori outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein Content. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, 2 jul. 2018.
- WANG, D. et al. Bacterial Vesicle-Cancer Cell Hybrid Membrane-Coated Nanoparticles for Tumor Specific Immune Activation and Photothermal Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 37, p. 41138–41147, 2020a.
- WANG, G. et al. **The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of klebsiella pneumoniae**. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. MDPI AG, , 1 set. 2020b.
- WANG, S.; GAO, J.; WANG, Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 11, n. 2, p. 1–29, 2019.
- WANG, X. et al. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuvanting bionanoparticles derived from engineered yersinia pestis. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 5, 2020c.
- WU, G. et al. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 24, p. 102148, 2020.
- WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. **Population genomics of Klebsiella pneumoniae**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, 1 jun. 2020.
- YE, C. et al. Inappropriate use of antibiotics exacerbates inflammation through OMV-induced pyroptosis in MDR Klebsiella pneumoniae infection. **Cell Reports**, v. 36, n. 12, 21 set. 2021.

- YETISGIN, A. A. et al. **Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications.** *Molecules* MDPI AG, 1 maio 2020.
- YU, L. et al. **When Natural Compounds Meet Nanotechnology: Nature-Inspired Nanomedicines for Cancer Immunotherapy.** *Pharmaceutics.* MDPI, 1 ago. 2022.
- ZARRELLA, T. M. et al. Host-Adaptation of *Francisella tularensis* alters the bacterium's Surface-Carbohydrates to hinder effectors of innate and adaptive immunity. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, 2011.
- ZAVAN, L. et al. Helicobacter pylori Growth Stage Determines the Size, Protein Composition, and Preferential Cargo Packaging of Outer Membrane Vesicles. *Proteomics*, v. 19, n. 1–2, 1 jan. 2019.
- ZENG, Y. et al. **Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy.** *Acta Pharmaceutica Sinica B.* Chinese Academy of Medical Sciences, 1 ago. 2022.
- ZHANG, D. et al. **Drug-loaded PEG-PLGA nanoparticles for cancer treatment.** *Frontiers in Pharmacology* Frontiers Media S.A., 19 ago. 2022.
- ZHANG, J. et al. Outer membrane vesicles derived from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* stimulate the inflammatory response. *Microbial Pathogenesis*, v. 154, 1 maio 2021.
- ZHANG, W.; HUANG, X. **Stem cell membrane-camouflaged targeted delivery system in tumor.** *Materials Today Bio* Elsevier B.V., 1 dez. 2022.
- ZHANG, Y. et al. Design of outer membrane vesicles as cancer vaccines: A new toolkit for cancer therapy. *Cancers*, v. 11, n. 9, p. 1–24, 2019a.
- ZHANG, Y. et al. Inhibition of Pathogen Adhesion by Bacterial Outer Membrane-Coated Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, v. 131, n. 33, p. 11526–11530, 12 ago. 2019b.
- ZHENG, D. et al. **Antibacterial Mechanism of Curcumin: A Review.** *Chemistry and Biodiversity* Wiley-VCH Verlag, 1 ago. 2020.
- ZHOU, Y. et al. Curcumin modulates macrophage polarization through the inhibition of the toll-like receptor 4 expression and its signaling pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 36, n. 2, p. 631–641, 2015.
- ZIELINSKA, A. et al. **Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology.** *Molecules* MDPI AG, 1 ago. 2020.
- ZIENLINSKA, A. et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, v. 25, n. 3731, 2020.