

Ana Cláudia Falcão Pica-milho

Desenvolvimento de uma vacina oral contra
Giardia lamblia



Julho de 2015

Esta tese é fornecida na condição de que quem a consulta conhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

Agradecimentos

Com a finalização deste trabalho gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para a sua realização:

À minha orientadora Professora Doutora Olga Borges, pela oportunidade de realizar este trabalho no seu laboratório, proporcionando-me assim uma boa aprendizagem, importante na minha evolução, tanto a nível profissional como pessoal. Um agradecimento especial por todo o apoio, disponibilidade e incentivo demonstrados.

À minha co-orientadora Professora Doutora Maria do Céu Sousa pela oportunidade de desenvolver a parte final do trabalho no seu laboratório. Agradeço a sua disponibilidade, acompanhamento e incentivo durante este tempo.

Às meninas do Nanolab, Edna Soares, Sandra Jesus, Filipa Lebre e Dulce Bento por toda a ajuda ao longo deste ano. A vossa simpatia, disponibilidade, apoio e boa disposição foram contributos essenciais ao longo deste trabalho. Obrigada por me ensinarem e ajudarem sempre que necessário nas tarefas deste longo trabalho.

Ao Doutor André Almeida da empresa Hitag, pela colaboração na cedência do antigénio para a realização do projeto.

Às meninas do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelo apoio, ajuda e boa disposição.

Aos meninos e meninas investigadores do 1º Piso da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho. Obrigada pela vossa simpatia, disponibilidade e companhia.

A todos os meus amigos, por todo o apoio, não só ao longo deste ano, mas durante todo o percurso. Não vou enumerar, para não esquecer alguém, mas estas pessoas sabem quem são. Obrigada por todos os momentos, tanto de trabalho, como de convívio. Obrigada por terem tornado este caminho bastante mais agradável e fácil de percorrer. Um agradecimento especial aos amigos e colegas que se encontram em Coimbra, por terem partilhado comigo a vida durante este ano. Por o terem tornado um ano com óptimas recordações e por todo o apoio, amizade e paciência indispensáveis.

Por último, mas não menos importantes, quero agradecer à minha família, em especial aos meus pais por todo o acompanhamento, compreensão, incentivo e confiança demonstrados ao longo da minha vida. Só com o vosso apoio incondicional foi possível concluir mais uma importante etapa da minha vida.

Resumo

Giardia lamblia é o parasita mais comum em todo mundo, responsável por vários distúrbios intestinais, principalmente diarreia e síndrome de má absorção. A infecção por *Giardia* tem um impacto adverso sobre o crescimento infantil e desenvolvimento psicomotor.

Dado ser uma infecção que afeta a população a nível mundial, a comunidade científica tem apostado no desenvolvimento de uma vacina que previna esta doença, de modo a diminuir a sua incidência e proteger a população.

Desta forma, com este projeto pretendeu-se desenvolver uma vacina oral baseada na encapsulação de um antigénio deste parasita, β -giardina, em nanopartículas de quitosano revestidas por alginato de sódio de forma a torná-las resistentes à sua passagem pelo estômago e, assim, chegarem ao seu alvo intactas. A primeira parte do trabalho consistiu na preparação das nanopartículas e sua caracterização. Numa segunda fase, as nanopartículas carregadas com o antigénio foram administradas a murganhos fêmea e pesquisaram-se os níveis de anticorpos totais e específicos no soro, lavagens intestinais, lavagens vaginais e fezes. Os efeitos *in vitro* dos lavados intestinais e do soro na aderência e morfologia do parasita foram também avaliados.

Neste trabalho obteve-se uma eficácia de encapsulamento do antigénio de β -giardina de 100 %. Através do método de ELISA verificou-se a presença de IgG específica anti- β -giardina no soro e aumento do seu título após reforços. Observou-se igualmente uma concentração de IgA total maior nos animais imunizados que no grupo controlo. Nos lavados intestinais detetaram-se concentrações elevadas de IgA total, no entanto não foi possível detectar IgG e IgA específicas anti- β -giardina. Relativamente aos estudos *in vitro*, os lavados intestinais inibiram a aderência do parasita em 7 %.

A vacina desenvolvida, baseada em nanopartículas de quitosano revestidas com alginato e carregadas de antigénio β -giardina, induziu uma resposta imunológica adaptativa nos animais em estudo. Houve produção de anticorpos ao nível da mucosa intestinal e no soro, nomeadamente IgA e IgG. Os resultados obtidos nos testes de aderência indicam uma inibição da aderência do parasita potencialmente devido aos anticorpos presentes nos lavados intestinais.

Palavras Chave: *Giardia lamblia*, infecção, nanopartículas, quitosano, intestino, IgA.

Abstract

Giardia lamblia is the most common protozoan parasite worldwide, responsible for several intestinal disorders, particularly diarrhea and malabsorption syndrome. *Giardia* infection have an adverse impact on child growth and psychomotor development.

Since it is an infection that affects the population worldwide, the scientific community has focused on developing a vaccine to prevent this disease in order to reduce its incidence and protect the population.

Thus, with this project we intended to develop an oral vaccine based on encapsulating an antigen of this parasite, the β -giardin, in nanoparticles of chitosan-coated sodium alginate in order to make them resistant to their passage through the stomach and, thereby, reach their target intact. The first step of this work is the preparation and characterization of nanoparticles. In a second step, nanoparticles loaded with the antigen were administered to female mice and researched levels of total and specific antibodies in the serum, intestinal washes, vaginal washes and stool. The *in vitro* effects of washed intestinal and serum in adhesion and morphology of the parasites were also evaluated.

This work we obtained an encapsulation efficiency of antigen β -giardin 100 %. Through ELISA method verified the presence of anti- β -giardina-IgG specific in serum and increases its degree after boosts. There was also a greater concentration of the total IgA in immunized animals in the control group. However, the results were not conclusive about the quantification of specific IgG and IgA anti- β -giardin in washed intestinal. However, *in vitro* studies showed that washed intestinal of immunized animals inhibited the parasite adherence (7 %).

The vaccine developed, based on chitosan nanoparticles coated with alginate and loaded β -giardin antigen, managed to trigger an adaptative immune response in animals. The IgA and IgG antibody production was increased at the level of the intestinal mucosa and serum. The results of the adhesion assays indicate an inhibition of the parasite adherence, potentially due to antibodies present in intestinal washed.

Keywords: *Giardia lamblia*, infection, nanoparticles, chitosan, intestine (gut), IgA.

Índice Geral

Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Lista de abreviaturas	XIV
I. Introdução.....	I
1. Giardia lamblia	2
1.1. Morfologia.....	2
1.2. Ciclo de vida	3
2. Giardíase	5
2.1. Problema de saúde pública	5
3. Desafios no desenvolvimento de vacinas contra <i>Giardia</i>	6
3.1. Antígenos identificados.....	7
4. Vacinação Oral.....	8
4.1. Resposta Imune na Mucosa	9
5. Nanopartículas.....	11
5.1. Sistemas de entrega.....	12
5.2. Quitosano.....	13
5.3. β - Giardina ligado ao H-tag.....	15
6. Objectivos.....	16
II. Materiais e Métodos.....	17
1. Preparação de nanopartículas de quitosano	18
1.1. Carregamento das nanopartículas com proteínas modelo.....	18
1.2. Revestimento das nanopartículas	19
2. Optimização das nanopartículas.....	19

3.	Métodos de análise das nanopartículas.....	20
3.1.	Determinação Colorimétrica de quitosano pelo método “Cibacron Brilliant Red 3B-A dye binding”.....	20
3.2.	Caracterização das nanopartículas.....	20
3.3.	Avaliação da eficácia de encapsulamento da proteína nas nanopartículas	21
4.	Formulações usadas nos estudos de vacinação oral.....	21
4.1.	Preparação de nanopartículas carregadas com antígeno	21
4.2.	Revestimento das nanopartículas.....	22
4.3.	Avaliação da eficácia de encapsulamento do antígeno β -giardina em nanopartículas revestidas e não revestidas	22
5.	Estudos de Imunização	22
5.1.	Colheita de amostras dos fluídos biológicos	23
5.1.1.	Recolha e tratamento de sangue.....	23
5.1.2.	Recolha e tratamento de fezes.....	23
5.1.3.	Recolha e tratamento de lavagens intestinais.....	24
5.1.4.	Recolha e tratamento de lavagens vaginais.....	24
5.2.	Teste de ELISA para quantificação de anticorpos nas amostras recolhidas	24
6.	Estudos <i>in vitro</i> com culturas de <i>Giardia lamblia</i> (clone WBC6).....	26
6.1.	Preparação do meio de cultura TYI-S-33 modificado por Keister	26
6.2.	Estudos de inibição da aderência de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	27
III.	Resultados & Discussão.....	28
I.	Optimização e caracterização e das nanopartículas	29
I.1.	Efeito do tipo de sal sulfato no consumo de quitosano durante a preparação das NPs.....	29
I.2.	Efeito do tipo de agitação no consumo de quitosano durante a preparação de NPs.....	30
I.3.	Caracterização de nanopartículas não revestidas e após o seu revestimento com alginato de sódio.....	30

1.4.	Influência da concentração de quitosano no tamanho das nanopartículas....	31
1.5.	Influência da utilização de Tween 80 no tamanho das nanopartículas.....	32
1.6.	Estudo da variação da concentração de CaCl ₂ no potencial zeta das nanopartículas revestidas com alginato de sódio.....	33
1.7.	Estudo da eficácia de encapsulamento de proteínas modelo a diferentes temperaturas.....	34
1.8.	Efeito da concentração da proteína na solução do "cross-link" na eficiência de encapsulação nas NPs.....	35
1.9.	Encapsulamento do antígeno β - giardina.....	36
2.	Estudos de imunização	37
2.1.	IgG no soro.....	38
2.2.	IgG nas mucosas.....	40
2.3.	IgA total nos fluídos biológicos.....	42
2.4.	IgA específica nas mucosas.....	43
3.	Estudos <i>in vitro</i> com culturas de <i>Giardia lamblia</i> (Clone WBC6).....	45
IV.	Conclusões	47
V.	Bibliografia	55

Índice de Figuras

Figura I.1- Estruturas de Giardia lamblia (a) trofozoíto; (b) quisto. (Adaptado de ANKARKLEV et al., 2010).	3
Figura I.2- Esquema representativo do ciclo de vida de Giardia lamblia. (Adaptado de ANKARKLEV et al., 2010).	4
Figura I.3- Representação esquemática dos elementos linfóides no sistema imune intestinal. (Adaptado de http://www.nature.com/nri/journal/v3/n4/fig_tab/nri1057_F1.html).	9
Figura I.4- Expressão da IgA na mucosa após imunização oral. (Adaptado de HOLMGREN, 2005).	10
Figura I.5- Aplicação das nanopartículas em diferentes campos. (Adaptado de ZANAM, et al., 2014).	11
Figura I.6- Estrutura química do quitosano. (Adaptado de ISLAM et al., 2012).	12
Figura II.1- Esquema de imunização e recolha de fluídos biológicos. A marca a vermelho representa as recolhas de soro, a castanho recolhas de fezes, a amarelo lavagens vaginais e a verde lavagens intestinais.	23
Figura III.1- Consumo médio de quitosano pelas nanopartículas produzidas com ultraturax à velocidade máxima (velocidade 10). A quantificação do quitosano foi feita pelo método colorimétrico do “Cibacron Brilliant Red 3-B-A dye binding”. Os resultados apresentados representam o valor médio de 3 lotes de NPs independentes.	29
Figura III.2- Consumo médio de quitosano pelas nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio produzidas com ultraturax à velocidade máxima (velocidade 10) e com vórtex à velocidade máxima. A quantificação foi feita pelo método colorimétrico do “Cibacron Brilliant Red 3-B-A dye binding”. Os resultados apresentados representam a média dos resultados obtidos com 3 lotes independentes de NPs.	30
Figura III.3- Eficácia de encapsulamento de proteínas, em nanopartículas de quitosano/ sulfato de alumínio e quitosano/ sulfato de sódio em gelo (4 °C) e à temperatura ambiente (20 °C). A proteína foi medida através do método do micro BCA (n=3).	35
Figura III.4- Eficácia de encapsulamento de BSA, utilizando três concentrações diferentes, em nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio à temperatura ambiente através do método do micro BCA. Os resultados representam a média de valores encontrados em 3 lotes de NPs produzidos de forma independente.	36

Figura III.5- Eficácia de encapsulamento da BSA e de β -giardina na concentração de 0,00625 %, em nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio à temperatura ambiente através do método do micro BCA. Os resultados de encapsulamento da BSA representam a média do valores encontrados em 3 lotes de NPs produzidos de forma independente e os resultados de encapsulamento de β -giardina representam a média dos valores dos lotes utilizados de NPs para os estudos de imunização (n= 5).	37
Figura III.6- Títulos de anti- β -giardina IgG no soro dos animais imunizados ao longo do tempo de estudo quantificados através do método de ELISA (n=5).	38
Figura III.7- Níveis dos títulos de IgG anti- β -giardina no soro de cada um dos animais imunizados ao longo do estudo (n=5).	39
Figura III.8- Títulos de isótipos de IgG1 e IgG2c no soro dos animais imunizados no final do estudo in vivo (n=5).	40
Figura III.9- Absorvâncias obtidas das amostras de fezes dos animais em estudo relativamente à IgG, recolhidas em três tempos diferentes (n=5).	41
Figura III.10- Absorvâncias obtidas das amostras de lavagens intestinais dos animais em estudo relativamente à IgG (n=5).	41
Figura III.11- Absorvâncias obtidas das amostras de lavagens vaginais dos animais em estudo relativamente à IgG (n=5).	42
Figura III.12- Concentração de IgA total nos fluídos biológicos dos animais controlo e imunizados (n=5).	43
Figura III.13- Absorvâncias obtidas das amostras de fezes e lavagens intestinais dos animais em estudo relativamente à IgA específica (n=5).	44
Figura III.14- Absorvâncias obtidas das amostras de lavagens vaginais dos animais em estudo relativamente à IgA específica (n=5).	44
Figura III.15- Número de trofozoítos aderentes na presença das lavagens intestinais obtidas de animais controlo e animais imunizados (n= 3).	45
Figura III.16- Número de trofozoítos aderentes na presença de soro obtido de animais controlo e animais imunizados (n= 3).	46

Índice de Tabelas

Tabela II.1- Composição das soluções-padrão para determinação do quitosano.	20
Tabela II.2- Composição do caldo nutritivo do meio de cultura TYI-S-33 modificado por Keister.	26
Tabela III.1- Medições de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter).	31
Tabela III.2- Medições de tamanho e índice de polidispersão no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter).	32
Tabela III.3- Medições de tamanho e índice de polidispersão no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter).	33
Tabela III.4- Efeito do aumento da concentração de iões Ca^{2+} no potencial zeta das NPs revestidas com alginato de sódio. Média dos valores de potencial zeta no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter) (n=3).	34

Lista de abreviaturas

ADI - Arginine deiminase

APC - Antigen-presenting cell (Células apresentadoras de antígenos)

BCA - Bicinchoninic acid (Ácido bicinconínico)

BSA - Bovine serum albumin (Albumína de soro bovino)

Chi - Chitosan (Quitosano)

CWP - Cyst wall proteins (Proteína da parede do quisto)

DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

SD - Standard deviation

EE - Eficácia de encapsulamento

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)

IgA- Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

NPs - Nanopartículas

OCT - Ornithine carbamoyl transferase

OPD - Ortofenilenodiamina

ORBEA – Órgão responsável pelo bem estar animal

PBS - Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)

PBS-T - Phosphate buffered saline Tween 20 (Tampão fosfato salino com Tween 20)

PMSF - Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto de fenil metil sulfonil)

PP - Placas de Peyer

RNA - Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)

UV - Ultra-violeta

VSP - Variant-specific surface protein (Proteína de superfície variável)

I. Introdução

I. *Giardia lamblia*

Giardia lamblia, também conhecida como *Giardia intestinalis* e *Giardia duodenalis* é um parasita eucariota flagelado binucleado (ADAM, 2001; ANKARKLEV, et al., 2010). Este é um dos parasitas intestinais mais comuns no homem, animais domésticos, animais de exploração agrícola e mamíferos selvagens (FISHER, et al., 2013). *Giardia lamblia* está comumente associada à causa de diarreias em todo mundo (ADAM, 2001).

I.1. Morfologia

Giardia existe sob duas formas, quisto e trofozoíto, que alterna ao longo do seu ciclo de vida (ELMENDORF, 2003). O quisto é a forma resistente e de transmissão da infecção e o trofozoíto replica-se e fixa-se no epitélio intestinal causando a doença (ANKARKLEV, et al., 2010).

- **Quisto**

O quisto possui uma forma oval e mede de comprimento 8 a 12 μm e de largura 7 a 10 μm . Esta estrutura possui uma parede de 0,3 a 0,5 μm de espessura e é revestida internamente por uma dupla membrana. A parede é formada por 60 % de carboidratos e 40 % de proteínas que lhe confere estabilidade e assim protecção do meio ambiente, impedido a sua lise. Durante este estado o protozoário mantém-se metabolicamente inativo. Nesta fase do seu ciclo, o quisto possui quatro núcleos (ADAM, 2001; ANKARKLEV, et al., 2010) (Figura 1.1.a).

- **Trofozoíto**

O trofozoíto apresenta uma forma de gota e mede de comprimento 12 a 15 μm e de largura 5 a 9 μm (ANKARKLEV, et al., 2010). Esta forma do parasita tem corpos basais, de onde tem origem os seus oito flagelos, divididos em quatro pares denominados anteriores, posterior/lateral, ventral e caudal, que lhe confere a motilidade (ELMENDORF, 2003). House 2011 propõe que a motilidade flagelar antes da fixação seja um factor determinante na patogénese e colonização do intestino por parte do trofozoíto, contribuindo indirectamente para a sua fixação. O trofozoíto tem ainda dois núcleos e apresenta um organelo único, o disco adesivo, uma estrutura grande e rígida que permite a ligação do trofozoíto ao epitélio intestinal (ANKARKLEV, et al., 2010; SYED, 2003). Este é constituído por uma rede de microtúbulos que lhe

confere então essa estrutura rígida bem definida (ELMENDORF, 2003; ANKARKLEV, et al., 2010). O disco adesivo é uma estrutura abobadada, que mediante a fixação se torna mais côncavo (ELMENDORF, 2003) (Figura I.1.b).

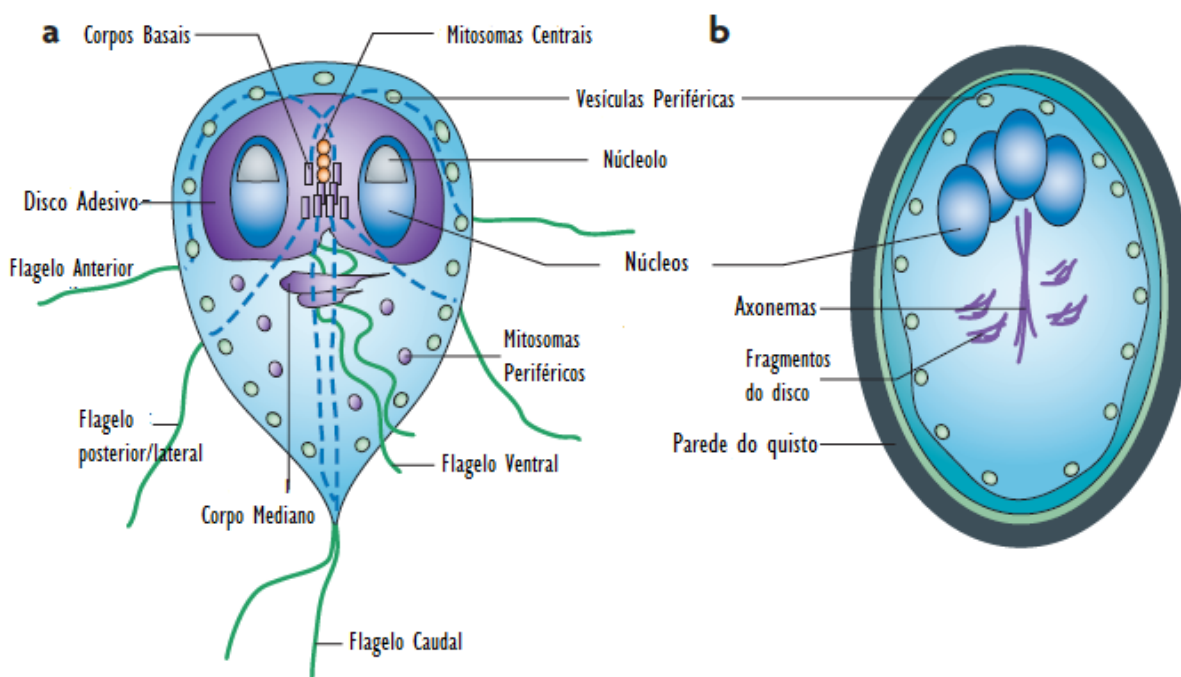


Figura I.1- Estruturas de *Giardia lamblia* (a) trofozoíto; (b) quisto. (Adaptado de ANKARKLEV, et al., 2010)

I.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida deste protozoário está claramente dividido em duas fases, a desenquistação e a enquistação.

• Desenquistação

Após a ingestão pelo hospedeiro o quisto torna-se metabolicamente activo e sofre desenquistação. Esta fase é desencadeada devido ao pH ácido do estômago, mas ocorre especificamente na parte inicial do intestino delgado, duodeno, onde sofre ruptura. Esta ruptura acontece devido à libertação por parte das vesículas periféricas (Figura I.1.b) de proteases de cisteína que promovem a degradação da parede do quisto. Inicialmente começam por emergir os flagelos num dos pólos do quisto e, de seguida, o corpo excizóide, que depois dará origem a quatro trofozoítos. O corpo excizóide possui quatro núcleos tetraplóides que se dividem duas vezes sem replicação de DNA, dando origem a quatro trofozoítos com dois núcleos diplóides cada (Figura I.2). Durante este processo de divisão há um aumento do

metabolismo que leva à formação do disco adesivo. Com o aparecimento do disco adesivo os trofozoítos ligam-se ao epitélio intestinal evitando desta forma os movimentos peristálticos. Os trofozoítos sofrem replicação assexuada binária e vão colonizando o intestino delgado. O processo de desenquistação é rápido, durando aproximadamente 15 minutos (ANKARKLEV, *et al.*, 2010; ADAM, 2001; WHO, 2002).

- **Enquistação**

Este processo ocorre quando os trofozoítos migram ao longo do intestino delgado. Os baixos níveis de colesterol, a elevada exposição à bÍlis e o aumento do pH induzem a enquistação. A enquistação pode dividir-se em duas fases, a fase inicial e a fase tardia. Na fase inicial, a síntese de proteínas da parede do quisto (CWPs) leva à formação de novas vesículas, específicas para a enquistação. Nesta fase, os flagelos do trofozoÍto são internalizados e o trofozoÍto perde a sua motilidade, e também perde a capacidade de adesão pois o disco adesivo sofre fragmentação e esses fragmentos ficam encerrados nas vesículas. Ocorre então, a replicação de DNA e a célula passa a possuir dois núcleos tetraplóides e na segunda fase dá-se a divisão do núcleo e passam a existir quatro núcleos diplóides. O DNA replica-se mais uma vez e origina quistos com quatro núcleos tetraplóides. Os quistos passam então ao longo do intestino e são excretados nas fezes e libertados no ambiente onde devido à sua rígida parede conseguem permanecer durante longos períodos de tempo (Figura I.2) (ANKARKLEV, *et al.*, 2010; ADAM, 2001; WHO, 2002).

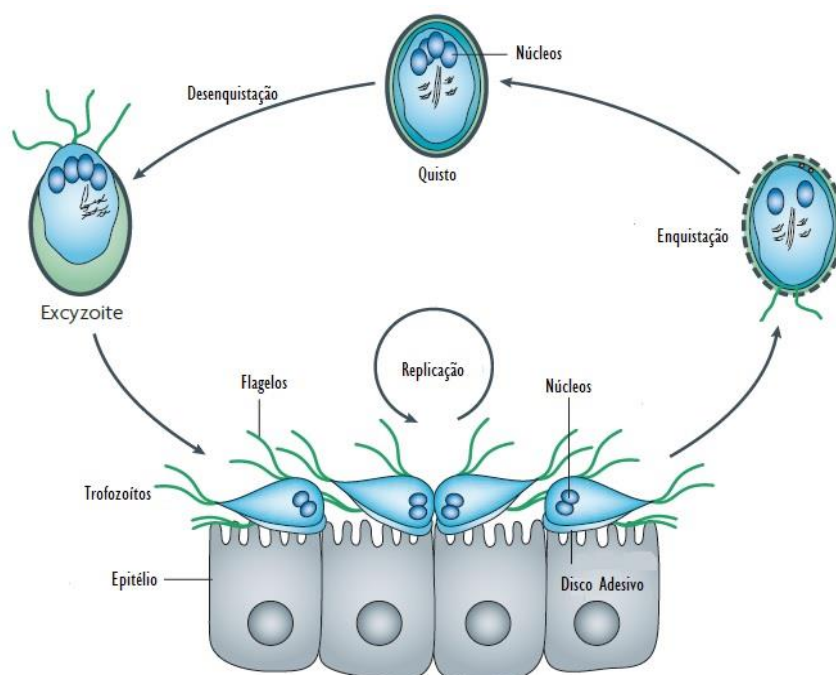


Figura I.2- Esquema representativo do ciclo de vida de *Giardia lamblia*. (Adaptado de ANKARKLEV, *et al.*, 2010)

2. Giardíase

A doença causada por *Giardia lamblia*, é denominada de giardíase. Esta patologia afecta o homem, animais de estimação, animais de exploração agrícola e mamíferos selvagens (WHO, 2002; BUSATTI, 2009).

A giardíase é normalmente transmitida através da ingestão de águas e alimentos contaminados com quistos do parasita. Estes são muito resistentes aos tratamentos comuns com desinfetantes e conseguem permanecer viáveis nas águas durante largos períodos de tempo. A transmissão também pode ser directa entre pessoas ou zoonótica entre animais e o homem, o que acontece num menor número de casos. Apenas são necessários 10 quistos para causar a infeção (WHO, 2002; ESCH, 2013).

Os sintomas ocorrem entre 6 a 15 dias após a infeção, mas muitos indivíduos são assintomáticos. Nos indivíduos sintomáticos a patologia caracteriza-se por desencadear diarreias, náuseas, vómitos e dor abdominal. Em casos mais graves também provoca perda de peso e má absorção. Estes últimos sintomas são particularmente indesejados em crianças devido a estas se encontrarem em fase de desenvolvimento e podendo dessa forma comprometer o seu desenvolvimento psicomotor (WHO, 2002; BUSATTI, 2009; JÚLIO, et al., 2012).

No tratamento desta doença são utilizados fármacos antimicrobianos. Na prática clínica os fármacos mais comuns são nitromidazóis, nomeadamente o metronidazole e tinidazole (WATKINS, 2014).

2.1. Problema de saúde pública

Estima-se que *Giardia lamblia* é responsável por mais de 280 milhões de infeções sintomáticas por ano no homem (ESCH, 2013).

Nos países em desenvolvimento esta doença tem uma elevada prevalência, devido à falta de saneamento básico e higiene precária. É muito comum nestes países as crianças serem afectadas por esta patologia. Estas características associadas ao facto de um baixo número de quistos (10 quistos) provocar uma infeção coloca este organismo entre os patógenos mais críticos aquando da produção de água potável a partir de águas superficiais. Em países desenvolvidos, industrializados têm sido documentados surtos de giardíase que ocorrem por causa da entrada de quistos na água potável devido a falhas no tratamento das águas

superficiais, contaminações da fonte e fugas no sistema de distribuição das águas (WHO, 2002; BUSATTI, 2009; ESCH, 2013).

Este parasita ao afectar também animais de exploração agrícola pode levar á perda de produtividade e provocar um grande impacto a nível económico (ANKARKLEV, *et al.*, 2010).

3. Desafios no desenvolvimento de vacinas contra *Giardia*

Não está disponível nenhuma vacina humana para a giardíase (WATKINS, 2014).

Apenas ao nível veterinário existe uma vacina contra este parasita, a GiardiaVax (WATKINS, 2014). Esta vacina tem sido utilizada como forma preventiva da doença em cães e gatos reduzindo os sintomas e a durabilidade dos quistos no meio ambiente (OLSON, *et al.*, 2001). Olson (2001) propôs que esta vacina pudesse ser utilizada como imunoterapia no tratamento da giardíase quando o tratamento de 1ª linha falhasse. No entanto, esta sua aplicação continua em discussão. A vacina, a GiardiaVax é constituída por lisados de trofozoítos de cães, gatos, ovelhas e isolados humanos (OLSON, *et al.*, 2001).

Em 2010, uma vacina utilizando como antigénio proteínas de superfície variável (VSPs) de trofozoítos transgénicos de isolados humanos foi testada em gerbilos (RIVERO, *et al.*, 2010). As VSPs são proteínas integradas na membrana dos trofozoítos e cada trofozoíto expressa apenas uma delas de cada vez e num determinado tempo. Pensa-se que é através desta variabilidade antigénica que o parasita evade o sistema imunológico do hospedeiro. A equipa responsável pelo estudo conseguiu cessar a variação antigénica e obter trofozoítos transgénicos a expressar todas as VSPs. Essas VSPs foram purificadas, suspendidas em PBS e administradas oralmente em gerbilos, que posteriormente foram inoculados com parasitas que expressavam apenas uma VSP. Através da detecção de quistos nas fezes dos gerbilos conseguiram mostrar que os animais imunizados estavam protegidos contra infecções de *Giardia lamblia*, pois não foram encontrados quistos nas suas fezes. Num outro estudo (JENIKOVA, *et al.*, 2011), investigadores testaram quatro antigénios, alfa-giardina, alfa-enolase, OCT e ADI, para o desenvolvimento de uma vacina utilizando um vector vivo atenuado de *Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. Inicialmente produziram plasmídeos que expressassem a síntese de cada um dos antigénios e verificaram que um dos antigénios, o ADI, não era expresso, e assim fizeram a inserção de três tipos de plasmídeos no vector. Para testar a imunogenicidade das três vacinas, o grupo imunizou BALB/c adultos oralmente e verificou que apenas dois dos antigénios, alfa-giardina e alfa-enolase, induziram resposta tanto no soro como

na mucosa produzindo, respectivamente, IgG e IgA. Por fim, infectaram os animais com trofozoítos e demonstraram que os animais imunizados com o vector que expressava a alfa-giardina eram os que tinham o número mais baixo de trofozoíto no intestino delgado, ou seja, conferiu uma maior protecção. Assim, concluíram que a alfa-giardina seria o melhor candidato para uma vacina contra a giardíase.

3.1. Antígenos identificados

A chave para o desenvolvimento de vacinas contra a giardíase está na identificação do antígeno correcto, com capacidade de protecção eficaz (JENIKOVA, *et al.*, 2011). Várias proteínas já foram identificadas em *Giardia lamblia* como potenciais antígenos para vacinas, nomeadamente as proteínas de superfície variável, com baixa taxa de conservação genética e uma grande variabilidade, e as proteínas de base conservadora (JENIKOVA, *et al.*, 2011). Cerca de 190 VSPs expressas pela *Giardia* foram já identificadas. Estas proteínas ocorrem num determinado trofozoíto durante um espaço de tempo indefinido e numa dada altura do seu desenvolvimento. Sabe-se que são reguladas através de RNA de interferência (PRUCCA, *et al.*, 2008).

Estão identificadas ao nível do disco adesivo do trofozoíto proteínas conhecidas como pertencentes à família das Giardinas, que incluem as anexinas (alfa-giardina), assemblinas de fibras estriadas (beta-giardina) e proteínas microrribons (δ e γ giardinas) (FELIZIANI, *et al.*, 2011). Foram identificadas 21 formas de alfa-giardina que se encontram a nível intracelular, não se sabendo quais as funções que desempenham, mas podendo ter um papel funcional ao nível da motilidade e fixação do trofozoíto ao epitélio intestinal (FELIZIANI, *et al.*, 2011; MACARISIN, *et al.*, 2012). A proteína β -giardina também se desconhece qual a sua função mas foi demonstrado que a sua localização está associada à zona dorsal do disco adesivo e há indícios que possa ser expressa ao longo de toda a superfície do disco adesivo assim como a δ -giardina (MACARISIN, *et al.*, 2012).

4. Vacinação Oral

A vacinação é provavelmente a melhor estratégia de prevenção contra muitas doenças. Actualmente a via de administração amplamente utilizada é a parental, tanto por via intramuscular como subcutânea (ISMAL, et al., 2012).

Mas ao longo das últimas décadas têm sido produzidas e testadas vacinas para as mucosas. As mucosas são a primeira linha de defesa contra os patógenos, sendo também muitas vezes onde a infecção se inicia (AZIZI, et al., 2010; HOLMGREN, 2005). Nas vacinas para as mucosas existem duas vias que são extensamente estudadas, a via nasal e a via oral (ISMAL, et al., 2012).

As vacinas de administração oral tem a capacidade de induzir resposta tanto ao nível da mucosa como a nível sistémico. Está provado que a administração oral consegue ao nível da mucosa desencadear tanto uma resposta humoral como celular, protegendo desta forma não apenas a zona de exposição ao antigénio mas os vários componentes da mucosa (AZIZI, et al., 2010; HOLMGREN, 2005).

A vacinação oral apresenta vantagens, tais como:

- O aumento das respostas imunitárias sistémicas e na mucosa;
- A facilidade de scale up;
- Uma maior adesão por parte dos indivíduos, pois muitos têm fobia a agulhas;
- A fácil administração;
- A sua segurança;
- O facto de não ser necessário um profissional de saúde para a vacina ser administrada.

O que no caso de países em desenvolvimento, com falta de profissionais qualificados torna a toma da vacina mais fácil e acessível a todos.

Como desvantagens apresenta a questão da necessidade de utilização de uma dose mais elevada de antigénio, a falta de estabilidade dos antigénios perante as condições adversas do trato gastrointestinal e a indução de tolerância por parte de alguns animais (AZIZI, et al., 2010; HOLMGREN, 2005, ISLAM, et al., 2012).

Contudo existe um baixo número de vacinas orais aprovadas, o desenvolvimento de vacinas para a administração oral enfrenta alguns desafios ao nível da estabilidade do antigénio no trato gastrointestinal, a falta de ensaios padrão e a dificuldade de colheita e processamento das amostras de secreções (AZIZI, et al., 2010).

4.1. Resposta Imune na Mucosa

Um amplo e altamente especializado sistema imunitário inato e adaptativo na mucosa protege estas superfícies, e também o interior do organismo de eventuais insultos do meio ambiente. O sistema imunitário na mucosa possui três funções principais:

- Prevenir a captura de antígenos não degradados, como proteínas exógenas provenientes de alimentos, do ar ou de microorganismos comensais;
- Evitar o desenvolvimento de respostas imunitárias potencialmente prejudiciais contra esses antígenos, caso estes alcancem o interior do corpo;
- Proteger a membrana das mucosas contra a invasão e colonização por microorganismos potencialmente perigosos (HOLMGREN, 2005).

Ao nível da mucosa intestinal existem estruturas responsáveis pelo desencadear da resposta imunitária, tais como, nódulos linfáticos mesentéricos, folículos e Placas de Peyer(PP). As Placas de Peyer encontram-se na mucosa intestinal, nomeadamente na parte superior do intestino delgado que possuem à sua superfície as células M (Figura 1.3) (AZIZI, *et al.*, 2010; HOLMGREN, 2005).

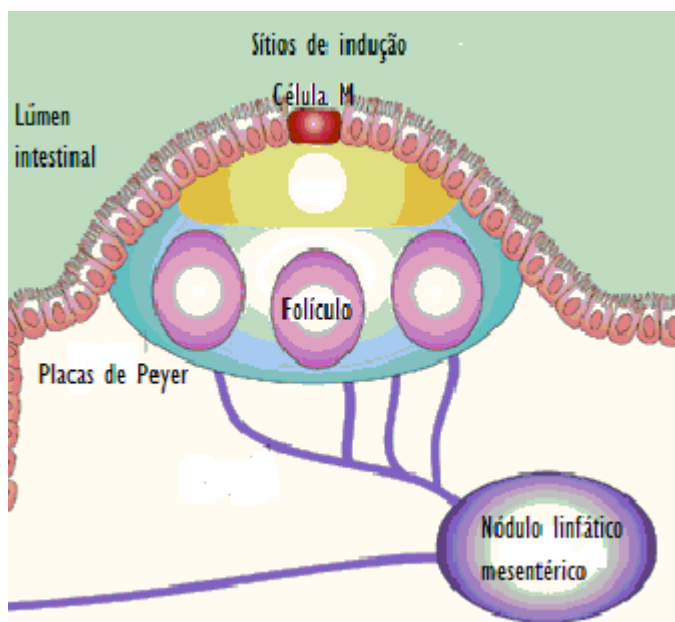


Figura 1.3- Representação esquemática dos elementos linfóides no sistema imune intestinal. (Adaptado de http://www.nature.com/nri/journal/v3/n4/fig_tab/nri1057_F1.html)

As células M são células epiteliais especializadas que capturam antígenos ou microorganismos do lúmen intestinal através de fagocitose, endocitose ou pinocitose. Os antígenos capturados pelas células M podem ser transportados ou directamente capturados

pelas células apresentadoras de antígeno, nomeadamente, células B, células dendríticas e macrófagos (AZIZI, *et al.*, 2010; HOLMGREN, 2005).

As respostas imunes na mucosa são reguladas pela natureza do antígeno e pelas APCs (células apresentadoras de antígeno) (HOLMGREN, 2005). A resposta imune humoral adaptativa na superfície da mucosa é grandemente mediada pela IgA, esta classe de imunoglobulina é a mais encontrada nas secreções humanas (CORTHÉSY, 2013; HOLMGREN, 2005).

Após a vacinação oral este anticorpo é produzido em várias partes do corpo como intestino delgado ou glândulas salivares (Figura I.4) (HOLMGREN, 2005; LYCHE, 2012). Este anticorpo pode ter qualidade suficiente para proteger eficazmente contra o patógeno. Também está descrito que o reforço das imunizações orais pode resultar no aumento de afinidade entre o antígeno e o anticorpo específico (LYCHE, 2012).

A IgA é o mecanismo de defesa humoral mais predominante na superfície da mucosa, enquanto que no soro é a IgG (CORTHÉSY, 2013).

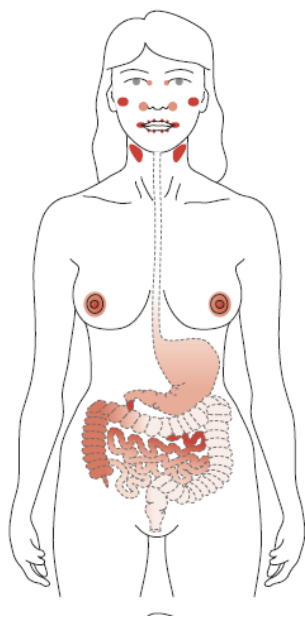


Figura I.4- Expressão da IgA na mucosa após imunização oral. (Adaptado de HOLMGREN, 2005)

5. Nanopartículas

As nanopartículas são encontradas naturalmente na atmosfera, águas naturais, solos e sedimentos. Tanto nanopartículas de origem natural, sintética ou semi-sintética podem ser aplicadas às mais diversas áreas, desde a agricultura, ao ambiente, à indústria e à biomedicina (Figura 1.5) (ZAMAN, *et al.*, 2014).

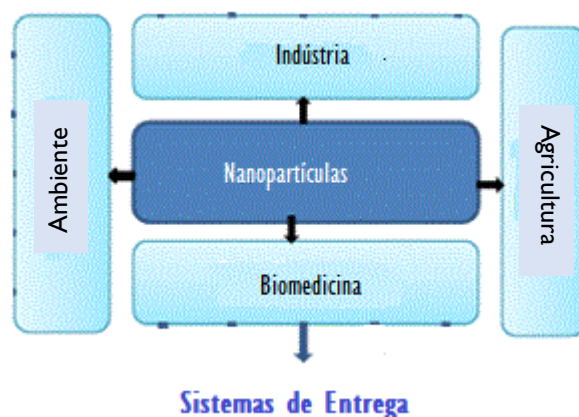


Figura 1.5- Aplicação das nanopartículas em diferentes campos. (Adaptado de ZANAM, *et al.*, 2014)

A composição das nanopartículas pode ser muito variada. Podemos ter nanopartículas compostas de materiais de origem biológica como lípidos, quitosano, fosfolípidos e dextrano, ou nanopartículas sintéticas que incluem a conjugação de polímeros, sílica e metais (DE JONG, 2008; ZAMAN, *et al.*, 2014). As nanopartículas também oferecem a vantagem de possuírem grupos funcionais, grupos amina e carboxilo, que podem ser utilizados para modificar a superfície das nanopartículas (ZAMAN, *et al.*, 2014).

Para caracterizar as nanopartículas em suspensão, o tamanho da partícula, dispersão de tamanhos, morfologia, composição química, área de superfície e reactividade são factores importantes que precisam ser investigados ou medidos com precisão (ELSABAHY, 2012; ZAMAN, *et al.*, 2014). O tamanho das nanopartículas é um dos parâmetros principais que influencia a interação entre as nanopartículas e as células dos sistemas biológicos. No que diz respeito a algumas áreas, nomeadamente, os sistemas de entrega de fármacos, as nanopartículas têm tamanhos superiores a 100 nm, necessários para que estas possam carregar as quantidades desejadas do fármaco (DE JONG, 2008). Partículas pequenas tem uma mobilidade relativa superior na captura intracelular, e têm uma ampla gama de alvos biológicos, quando comparadas com micropartículas, para o diagnóstico e tratamento da doenças. O

tamanho das nanopartículas têm influência na internalização destas pelas células (ZAMAN, et al., 2014).

Apesar da sua produção e uso em todo o mundo, há falta de informação relativamente aos efeitos adversos das nanopartículas na saúde humana e no meio ambiente. Estudos preliminares indicam que as nanopartículas podem afetar o comportamento biológico a nível celular, sub-celular, do tecido, do órgão e de níveis de proteínas. Mas a sua toxicidade deve ser ultrapassada antes da produção em larga escala, para aplicações seguras e eficientes nos campos farmacêutico e medicina. Estes efeitos indesejáveis podem dever-se ao seu pequeno tamanho, composição química, estrutura à superfície, solubilidade, forma e agregação. Um grande número de métodos padronizados têm sido abordados tanto *in vitro* como *in vivo* para avaliar a toxicidade das nanopartículas (ZAMAN, et al., 2014).

Existe um optimismo crescente em relação às nanotecnologias aplicadas à medicina, pois poderá trazer avanços na área de diagnóstico e tratamento de doenças (DE JONG, 2008; ELSABAHY, 2012). A utilização de nanotecnologias na medicina, mais especificamente na área de sistemas de entrega de fármacos e proteínas tem crescido muito rapidamente. No âmbito, das ciências farmacêuticas as nanopartículas tem sido ainda utilizadas de forma a reduzir a toxicidade e os efeitos secundários dos fármacos (DE JONG, 2008).

5.1. Sistemas de entrega

Os sistemas de entrega devem ser vistos como sistemas complexos e compreendidos numa escala nanométrica de 100 nm a 1000 nm. Os principais objectivos da investigação de nanobiotecnologias neste campo incluem a redução da toxicidade do fármaco, mantendo os efeitos terapêuticos, direccionamento e entrega mais específicos e maior segurança e biocompatibilidade (DE JONG, 2008). Então na busca por novos veículos de libertação tem que se dar especial atenção a determinadas características, tais como:

- Biodistribuição;
- Direcção;
- Biocompatibilidade;
- Incorporação e libertação do fármaco;
- Estabilidade da formulação;
- Immunogenicidade.

No que respeita a formulações de nanopartículas biodegradáveis, estas devem ter um tempo de vida limitado, mas o necessário para que a nível terapêutico seja óptimo, de modo que consigam transportar e libertar o seu conteúdo no local alvo de forma efectiva (DE JONG, 2008). Nos sistemas de entrega utilizados para vacinas é importante que o material utilizado não seja imunogénico, de forma a não haver uma resposta imunológica desenvolvida contra o material de que é feito o sistema transportador do antígeno. Vários transportadores poliméricos têm sido investigados, o quitosano aparece como um poderoso candidato devido, ao seu forte potencial para utilização como sistema de transporte de vacinas e não induzindo respostas indesejadas (ISLAM, *et al.*, 2012).

É importante ao desenvolver um sistema de entrega ter em conta a via de administração que será utilizada e quais são os locais alvo. Quando se pretende fazer uma entrega ao nível das mucosas devem utilizar-se nanopartículas mucoadesivas (ELSABAHY, 2012).

5.2. Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo catiónico com propriedades mucoadesivas, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina (BORGES, *et al.*, 2008; ISLAM, *et al.*, 2012; PORPORATTO, 2005). A quitina é encontrada nos invertebrados e é um componente do revestimento externo de crustáceos, de onde é habitualmente extraída (ISLAM, *et al.*, 2012; PORPORATTO, 2005).

O polímero quitosano possui vários grupos amina na sua estrutura (Figura 1.6), que o tornam um polímero fortemente positivo em meio ácido e com capacidade em reagir com polímeros de carga negativa assim como com a superfície das mucosas. Tendo em conta esta sua característica torna-se um polímero eficiente para entrega ao nível da mucosa (ISLAM, *et al.*, 2012).

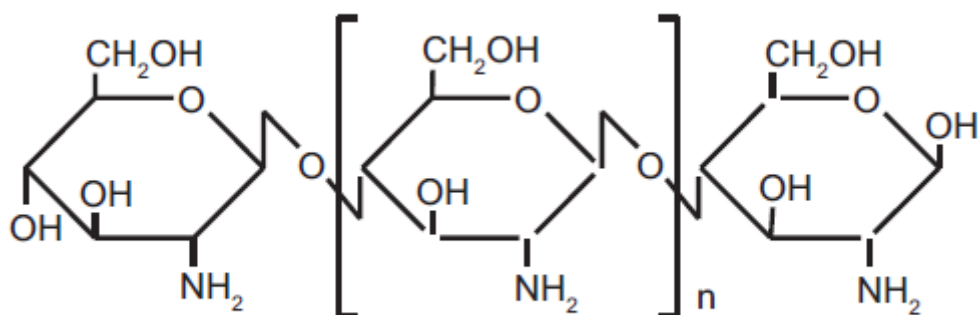


Figura 1.6 - Estrutura química do quitosano. (Adaptado de ISLAM *et al.*, 2012)

O quitosano possui características que o tornam apelativo para a sua utilização em várias áreas a nível industrial, nomeadamente a farmacêutica (DUTTA, 2004). As suas propriedades incluem a biodegradabilidade, a não toxicidade, biocompatibilidade, o seu baixo custo, a mucoadesividade e a capacidade de abertura das “tight junctions” (BORGES, *et al.*, 2008; DUTTA, 2004; ISLAM, *et al.*, 2012).

Tendo em conta estas características a sua utilização ao nível de sistemas de entrega de fármacos ou vacinas tem ganho espaço ao nível da investigação e indústria farmacêutica. Nos últimos anos têm surgido nanopartículas constituídas por este polímero como sistemas de entrega, que pode transportar fármacos, antigénios ou macromoléculas no seu interior ou adsorvidas à sua superfície (DUTTA, 2004; ISLAM, *et al.*, 2012).

Então na área da vacinação ao nível da mucosa, o quitosano dados as suas propriedades têm vantagens para o sucesso neste tipo de abordagem:

- Mucoadesividade: Esta vai prolongar o tempo de retenção das nanopartículas na mucosa. Dessa forma no caso de fármacos o efeito terapêutico destes é mais controlado e mantido por um período maior.

Em relação às nanopartículas de quitosano utilizadas para entrega de antigénios vai aumentar a quantidade de antigénio na mucosa e durante mais tempo de forma a permitir o aumento da sua internalização pelas células do sistema imunitário. Esta adesividade oferece várias vantagens para uma melhor absorção das vacinas no local alvo onde é induzida a resposta imune. As nanopartículas mucoadesivas conseguem manter-se mais tempo na mucosa intestinal, assim sendo os antigénios associados também, mas estão protegidos de proteases, dessa forma diminui a degradação do antigénio por parte das proteases.

- Biodegradabilidade: O quitosano para ser um polímero de eleição para entrega de fármacos ou antigénios tem de ser, após a entrega eficiente destes no local alvo degradado. Estudos indicam que o quitosano é eficientemente degradado e eliminado quando administrado nas condições adequadas. Nos humanos a degradação deste polímero está a cargo dos lisossomas (ISLAM, *et al.*, 2012).

5.3. β -Giardina ligado ao H-tag

O H-tag corresponde a uma sequência de onze aminoácidos da parte N-terminal do FH8, uma proteína de ligação ao cálcio secretada pela *Fasciola hepatica* (COSTA, *et al.*, 2012; COSTA, *et al.*, 2013).

O H-tag é uma cadeia polipeptídica de baixo peso molecular, que se liga à proteína desejada, simplifica a purificação da proteína, melhora a sua produção, aumenta a solubilidade da proteína, reduz a susceptibilidade à proteólise e aumenta a imunogenicidade. Assim, torna-se bastante interessante para a produção de antígenos e anticorpos recombinantes (COSTA, 2012; COSTA, 2013).

O antígeno β -Giardina ligado ao H-tag foi produzido de forma recombinante em *Escherichia coli*. Desenvolver o antígeno β -Giardina, um antígeno de superfície do parasita *Giardia lamblia*, com ligação ao H-tag pretende aumentar a sua imunogenicidade de forma a obter uma resposta imune mais eficaz. A produção deste antígeno é desenvolvida pela empresa Hitag Biotechnology.

Este parceiro de fusão não pode interferir na conformação do antígeno, e consequentemente, os anticorpos produzidos contra o antígeno fundido com o H-tag têm de possuir a capacidade de reconhecer a estrutura nativa do antígeno. O baixo peso molecular do H-tag pode ser a razão pela qual não é desencadeada uma resposta imune contra este parceiro de fusão mas, sim contra o antígeno, como desejado (COSTA, 2013).

6. Objectivos

No presente projeto de mestrado pretendeu-se desenvolver uma vacina oral contra o parasita *Giardia lamblia*. É importante referir que desenvolver uma vacina oral contra este parasita parece ser a forma de administração de vacina preferencial, dado o parasita se alojar na mucosa intestinal. Para atingir este objectivo encapsulou-se pela primeira vez o antigénio β -giardina ligado ao H-tag em nanopartículas de quitosano revestidas por alginato de sódio. É a primeira vez que se testa o antigénio β -giardina para ser utilizado pela via oral. Na literatura, não está publicado nenhuma tentativa de encapsular a β -giardina e utilizá-la como antigénio. Também ainda nada está publicado sobre a utilização deste por outras vias de administração.

Dentro deste projeto foram estabelecidos objectivos mais específicos:

- Caracterização e optimização das nanopartículas de quitosano revestidas com alginato;
- Obtenção de uma elevada eficácia de encapsulamento do antigénio nas nanopartículas;
- Administração oral das nanopartículas carregadas com o antigénio e pesquisa de anticorpos totais e específicos nos fluídos biológicos como soro, lavagens intestinais e fezes, dos animais imunizados;
- Avaliação da aderência e morfologia do parasita quando em contacto com as lavagens intestinais e soro dos murganhos imunizados.

II. Materiais e Métodos

I. Preparação de nanopartículas de quitosano

O quitosano foi dissolvido numa solução tampão acetato a pH=5, previamente preparada, de modo a obter uma concentração de 0,1 %. Foram preparadas soluções aquosas de sulfato de alumínio e sulfato de sódio, cada uma delas de modo a obter uma concentração de 0,5 % e 0,625 %, respectivamente.

A formação de nanopartículas foi obtida a partir da adição gota a gota das soluções de sulfato de alumínio ou de sulfato de sódio à solução de quitosano 0,1 %, em volumes iguais (2 mL). Para a mistura das soluções foram testadas duas formas diferentes de agitação, o ultraturax e o vórtex à velocidade máxima. A suspensão de nanopartículas resultante foi deixada 1 h em agitação moderada para maturação. Após esse período, a suspensão foi centrifugada durante 30 min a 5000 rpm e o sobrenadante foi recolhido para quantificar o quitosano que não ficou associado às partículas formadas. As nanopartículas foram ressuspendidas em água (2 mL) e essa suspensão foi utilizada para medir tamanhos e potenciais zeta das nanopartículas formadas.

I.1. Carregamento das nanopartículas com proteínas modelo

Neste trabalho foram testadas algumas proteínas modelo para avaliar a capacidade de eficiência de encapsulação nas nanopartículas preparadas. As proteínas modelo usadas no estudo foram a BSA, α -caseína, lisozima, ovalbumina e mioglobina.

As nanopartículas foram feitas segundo o método anteriormente descrito, com uma pequena alteração no protocolo. Nas soluções de sulfato de alumínio e sulfato de sódio foi adicionada a solução de uma dada proteína de modo a obter uma concentração de proteína nesta solução de 0,025 %. Prepararam-se soluções mais concentradas de sulfato de alumínio ou de sulfato de sódio, de modo, a manter a concentração anteriormente descrita destes sais.

1.2. Revestimento das nanopartículas

Com o objectivo de modificar a libertação da proteína modelo a partir das nanopartículas de quitosano, um segundo passo tecnológico foi executado. As nanopartículas foram revestidas com um segundo polímero, o alginato de sódio.

Seguindo o procedimento anteriormente descrito para a preparação de nanopartículas, após a sua re-suspensão em 2 mL de água, foi adicionado sob agitação um volume igual de solução de alginato de sódio a 1 % em tampão acetato. A suspensão foi colocada sob agitação magnética durante 20 min para o alginato se ligar à superfície das nanopartículas. No final dessa agitação a solução foi centrifugada a 1600 rpm por 10 min para eliminar o alginato em excesso e o sobrenadante foi recolhido para ver se houve alguma perda de proteína para o meio durante a fase de revestimento. As NPs foram novamente re-suspensas em água e finalmente adicionou-se sob agitação em vortéx 60 µL de uma solução de cloreto de cálcio (18 mM), para fazer o “cross-link” do revestimento e foi novamente deixada a solução em agitação magnética mais 20 min.

2. Optimização das nanopartículas

Neste trabalho foram testadas algumas condições diferentes na preparação e revestimento das nanopartículas para verificar se era possível melhorar as características destas. As condições testadas foram:

- Modo de agitação das nanopartículas, utilização do ultraturax e vortéx;
- Utilização de duas concentrações da solução de quitosano, 0,1 % e 0,05 %;
- Inclusão do Tween 80 a 0,1 % na solução de quitosano, produzindo-se nanopartículas com e sem Tween 80;
- Uso de concentrações diferentes da solução de cloreto de cálcio para fazer o “cross-link” das cadeias carboxílicas do alginato de sódio. Testaram-se concentrações de 18 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1200 mM e 1500 mM;
- Temperatura durante todo o processo de preparação e revestimento, tendo sido feitas nanopartículas à temperatura ambiente e em gelo;
- Várias concentrações de proteína, na solução do agente de “cross-link”. Tendo sido escolhidas concentrações de 0,025 %, 0,0125 %, 0,009375 % e 0,00625 %.

3. Métodos de análise das nanopartículas

3.1. Determinação Colorimétrica de quitosano pelo método “Cibacron Brilliant Red 3B-A dye binding”

Preparou-se uma solução de quitosano a 0,1 % como descrito no ponto anterior para ser usada como solução stock durante a preparação dos padrões para a recta de calibração. Foram preparadas também as soluções de “Cibacron Brilliant Red 3B-A dye binding” dissolvendo 0,075 g em 500 mL de água destilada e o tampão glicina/HCl (pH= 2,8). O tampão foi preparado a partir de uma solução de glicina de 0,2 M e de uma solução de HCl a 0,2 M. Mais precisamente foram diluídos em 200 mL de água destilada 50 mL da solução de glicina e 16,8 mL da solução de HCl.

Assim para a determinação do quitosano foram colocados 100 µL de tampão glicina/HCl e 1 mL de corante em cada tubo contendo um determinado volume da solução padrão ou a solução amostra (Tabela II.1). Finalmente foi adicionada água até perfazer um volume de 5 mL.

Tabela II.1- Composição das soluções-padrão para determinação do quitosano.

A: 0,008 %	40 µL Sol. Chi 0,1 % + 3860 µL água
B: 0,0012 %	60 µL Sol. Chi 0,1% + 3840 µL água
C: 0,0016 %	80 µL Sol. Chi 0,1% + 3820 µL água
D: 0,0020 %	100 µL Sol. Chi 0,1% + 3800 µL água
E: 0,0024 %	120 µL Sol. Chi 0,1% + 3780 µL água
F: 0,0028 %	140 µL Sol. Chi 0,1% + 3760 µL água
G: 0,0032 %	160 µL Sol. Chi 0,1% + 3740 µL água
Branco	3900 µL água

3.2. Caracterização das nanopartículas

Para caracterizar as nanopartículas, foram medidos os seus tamanhos e potenciais zeta, utilizando as alíquotas recolhidas na fase final de preparação das nanopartículas ou no caso de revestidas na fase final do seu revestimento, como é dito na descrição dessas tarefas. As medições foram feitas no aparelho Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter). As medições de tamanho e potencial zeta são feitas separadamente, na medição do tamanho uma porção da alíquota é misturada com água destilada e colocada numa cuvette de vidro no aparelho. No caso da medição de potencial zeta, a alíquota é dissolvida em água miliQ e colocada num porta-amostras próprio no aparelho.

3.3. Avaliação da eficácia de encapsulamento da proteína nas nanopartículas

Para avaliar a eficácia de encapsulamento das proteínas procedeu-se à quantificação da proteína não ligada às NPs, nos sobrenadantes recolhidos. Através do método micro BCA foi possível determinar indiretamente a concentração de proteína carregada nas nanopartículas. Para a utilização do método utilizou-se um kit de Micro BCA constituído por três reagentes, A, B e C. Esta técnica foi realizada em placas de 96 poços. Foram então feitos padrões segundo a descrição do kit.

Os padrões e amostras de soluções de nanopartículas foram colocados em poços, 100 µL de cada e foi adicionado 100 µL do reagente micro BCA. A placa foi a incubar durante 2 h a 37 °C. Passadas as 2 h a placa é retirada, e são lidas as absorvâncias a 562 nm num aparelho de medição de placas.

A eficácia de encapsulamento (EE) é calculada da seguinte forma:

$$EE (\%) = \frac{(\text{quantidade total de antígeno} - \text{antígeno livre})}{\text{quantidade total de antígeno}} * 100$$

4. Formulações usadas nos estudos de vacinação oral

4.1. Preparação de nanopartículas carregadas com antígeno

O quitosano foi dissolvido numa solução tampão acetato (pH=5) de modo a obter uma concentração de 0,1 %. O antígeno β-giardina modificado foi dissolvido numa solução de sulfato de sódio de modo a obter no final uma concentração de antígeno de 0,00625 % e 0,625 % de solução de sulfato de sódio.

A formação de nanopartículas foi obtida a partir da adição gota a gota da solução de sulfato de sódio a 0,625 % contendo o antígeno à solução de quitosano 0,1 %, em quantidades iguais (2 mL) no vortéx. A solução resultante foi deixada 1 h em maturação sob agitação. Após esse período, a suspensão resultante foi centrifugada durante 30 min a 5000 rpm e o sobrenadante foi recolhido para posterior quantificação do antígeno. As nanopartículas foram re-suspendidas no volume pretendido utilizando água miliQ.

4.2. Revestimento das nanopartículas

O procedimento seguido para fazer o revestimento das nanopartículas foi igual ao anteriormente descrito (secção 1.2. Revestimento de nanopartículas).

4.3. Avaliação da eficácia de encapsulamento do antígeno β -giardina em nanopartículas revestidas e não revestidas

Para se avaliar a eficácia de encapsulamento do antígeno em nanopartículas revestidas e não revestidas procedeu-se à quantificação da proteína nos sobrenadantes recolhidos. Através do método micro BCA foi possível determinar indiretamente a concentração de proteína carregada nas nanopartículas, de modo análogo ao procedimento descrito anteriormente (secção 3.3. Avaliação da eficácia de encapsulamento da proteína nas nanopartículas).

5. Estudos de Imunização

Para a realização dos estudos *in vivo* foram utilizados murganhos fêmea C57BL/6J com oito semanas (CHARLES RIVER LABORATORIES France). Foram devidamente acondicionados no biotério da Faculdade de Farmácia, onde decorreram as experiências devidamente aprovadas pela comissão de ética ORBEA.

No estudo foram enquadrados os animais em dois grupos, o grupo I, no qual os animais foram imunizados com nanopartículas carregadas de antígeno β -giardina e o grupo II, o grupo controlo no qual os animais não receberam qualquer tipo de imunização.

O esquema de imunização está ilustrado na figura II.1. O grupo I foi imunizado primeiro pela via subcutânea com nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio carregadas com o antígeno β -giardina, com o objectivo de ter animais sem stress durante a administração das formulações, os animais foram ligeiramente anestesiados com isoflurano. De seguida foram dados três reforços orais com sonda gástrica e sem os animais anestesiados com nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio revestidas de alginato de sódio e por último um 4º reforço administrado subcutaneamente. Uma semana após a última imunização os animais foram sacrificados por deslocamento cervical com anestesia de isoflurano.

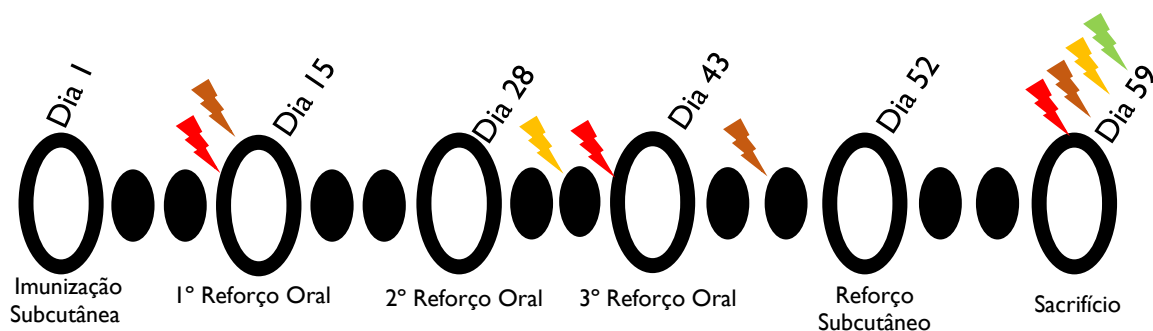


Figura II.1- Esquema de imunização e recolha de fluídos biológicos. A marca a vermelho representa as recolhas de soro, a castanho recolhas de fezes, a amarelo lavagens vaginais e a verde lavagens intestinais.

Nas imunizações subcutâneas foram administrado aos animais 200 μ L da suspensão contendo 50 μ g de antígeno nas nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio carregadas e nas imunizações orais foram administrado um volume de 300 μ L da suspensão contendo 100 μ g de antígeno nas nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio revestidas com alginato. As formulações administradas encontram-se descritas acima.

5.1. Colheita de amostras dos fluídos biológicos

O calendário de recolhas de amostras encontra-se ilustrado na figura II.1.

5.1.1. Recolha e tratamento de sangue

O sangue foi recolhido num eppendorf após um pequeno corte com a lanceta na face do animal ligeiramente anestesiado com isoflurano. Foram recolhidos cerca de 100 μ L de sangue, apenas na colheita final foi recolhido um volume superior. O sangue foi mantido em repouso durante 30 min à temperatura ambiente e após esse tempo centrifugado a 7000 rpm durante 10 min. O soro foi separado e guardado a -80 °C, até ser necessário para análises.

5.1.2. Recolha e tratamento de fezes

As fezes foram recolhidas para tubos eppendorf previamente tarados. Depois foram re-hidratadas durante 60 min à temperatura ambiente com PBS frio a pH=7,4. Por cada 0,1 g de fezes foram re-hidratadas com 1 mL de PBS. No final foram vortexadas e centrifugadas durante 15 min a 6000 rpm. O pellet foi rejeitado e foi adicionado ao sobrenadante PMSF de forma a

obter uma concentração final de 1 mM. Estes foram incubados à temperatura ambiente durante 15 min e no final foram congelados a -80 °C.

5.1.3. Recolha e tratamento de lavagens intestinais

Para obter as lavagens intestinais cortou-se aproximadamente 20 cm do início do intestino e lavou-se fazendo passar com uma seringa 1,2 mL de PBS (pH= 7,4) e cada lavagem foi colocada num eppendorf (este procedimento é realizado em gelo). Adicionou-se de seguida a PMSF de modo a obter na lavagem uma concentração de 1 mM. Incubou-se durante 15 min sob agitação à temperatura ambiente e de seguida os extractos foram centrifugados a 6000 rpm durante 15 min a 4 °C. Por fim foi recolhido o sobrenadante e guardado a -80 °C.

5.1.4. Recolha e tratamento de lavagens vaginais

Foi lavada a cavidade vaginal dos animais, injectando cerca de 110 µL de PBS na cavidade vaginal e recolhendo de seguida. O procedimento foi repetido 4 vezes, as fracções de lavagens foram reunidas em tubo eppendorf. Em seguida, adicionou-se PMSF e a azida de sódio às lavagens de forma a ter uma concentração final, na lavagem 1 mM PMSF e 0,1 % de azida de sódio. Incubaram durante 15 min à temperatura ambiente e foram a centrifugar a 6000 rpm durante mais 15 min. No final o pellet foi rejeitado e o sobrenadante guardado a -80 °C.

Todas as amostras foram guardadas devidamente a -80 °C para posteriormente serem analisadas. Com o objectivo de determinar se os animais desenvolveram resposta imunológica contra o antígeno da *Giardia* (β -giardina) foi utilizado o método de ELISA que permitiu quantificar anticorpos. Neste estudo, foram pesquisadas a IgA total e específica e de IgG específica. Utilizou-se um kit da BETHYL para a determinação de IgA (Mouse IgA ELISA Quantification kit Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA).

5.2. Teste de ELISA para quantificação de anticorpos nas amostras recolhidas

Foram revestidas placas de 96 poços (Nunc immunoplate maxisorb) com o antígeno β -giardina, diluído em tampão de revestimento (carbonato de sódio a 50 Mm; pH= 9,6) de modo a obter por poço 1 µg de atígeno em 100 µL de volume de tampão. Após o revestimento a placa, esta foi coberta com parafilme e incubou durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, o

antigénio de captura foi rejeitado e a placa foi com PBS-T (PBS contendo 0,05 % de Tween 20) três vezes. Foi feito o bloqueio adicionando 200 μL de solução bloqueadora, PBS-T, a cada poço para bloquear os locais remanescentes de adsorção. A placa foi selada e incubou durante 1 h a 37 °C. Removeu-se a solução bloqueadora e lavou-se a placa 5 vezes com PBS-T. Adicionou-se 100 μL de amostra em cada poço, tapou-se a placa e incubou a 37 °C durante 2 h. Removeram-se as amostras e lavou-se a placa 5 vezes com PBS-T. Foi adicionado 100 μL da solução do anticorpo secundário ligado à HRP, a cada poço e a placa foi incubada a 37 °C durante 30 min. A solução com o anticorpo foi posteriormente removida e a placa foi lavada 6 vezes com PBS-T. Por fim adicionou-se a cada poço 100 μL de solução de OPD, feita a partir da dissolução de uma pastilha de 5 mg em 10 mL de tampão citrato com 10 μL de H_2O_2 . A placa foi a incubar durante 10 min à temperatura ambiente, após esse tempo a reacção foi interrompida através da adição de 50 μL de solução STOP (1 M H_2SO_4). A placa foi colocada num leitor de placas ELISA para medir a sua absorvância a 492 nm usando o filtro de referência de 530 nm e as ligações aos anticorpos foram reveladas.

6. Estudos *in vitro* com culturas de *Giardia lamblia* (clone WBC6)

6.1. Preparação do meio de cultura TYI-S-33 modificado por Keister

O meio de cultura é constituído por um caldo nutritivo (A) e uma solução de cisteína-bílis (B) preparadas separadamente, e suplementado com soro bovino inativado e antibióticos. O caldo nutritivo (A) foi preparado dissolvendo os constituintes apresentados na tabela II.2.

Tabela II.2- Composição do caldo nutritivo do meio de cultura TYI-S-33 modificado por Keister.

K_2HPO_4	1,0 g
KH_2PO_4	0,6 g
NaCl	2,0 g
Casitona	20,0 g
Extrato de levedura	10,0 g
Glicose	10,0 g
Ácido ascórbico	0,2 g
Citrato férrico amoniacal	0,023 g
Água	800,0 mL

O caldo nutritivo foi esterilizado por filtração, utilizando-se filtros de membrana 0,22 μ m, alicotado em frascos estéreis de 200 mL e congelado a -20 °C. Este caldo nutritivo congelado tem uma validade de 6 meses.

Para obter o meio completo, uma solução de cisteína-bílis (B) foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de cisteína em 25 mL de água e de seguida adicionou-se 0,15 g de bílis bovina. O pH desta solução foi acertado com uma pastilha de NaOH até a solução ficar límpida. A solução foi esterilizada utilizando um sistema filtrante, com um filtro de seringa de poro de 0,2 μ m.

O caldo A assim como o soro bovino inativado apenas foram descongelados na altura em que se preparava o meio completo utilizando-se um banho de água a 37 °C. O meio de cultura completo preparou-se misturando 200 mL de caldo A com 25 mL de solução B, 25 mL de soro bovino inativado e 20 μ L de penicilina/estreptomicina. O meio completo foi

armazenado a 4 °C no frigorífico durante um máximo de 10 dias, período a partir do qual o meio perde as suas características e não suporta o crescimento dos trofozoítos de *G. lamblia*.

6.2. Estudos de inibição da aderência de trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para a realização dos estudos da aderência dos trofozoítos de *G. lamblia* é necessário primeiro obter uma cultura em fase exponencial e proceder à contagem das células.

Assim sendo, foi retirado da estufa de incubação um tubo de cultura de trofozoítos de *Giardia lamblia* (clone WBC6) em fase de crescimento exponencial (3-5 dias) e colocado em banho de gelo durante pelo menos 20 minutos. Posteriormente, retirou-se 1 mL da cultura para um eppendorf e adicionou-se 10 µL de formalina a 10 % e homogeneizou-se. Transferiu-se 10 µL para a câmara de Neubauer e procedeu-se à contagem das células no retículo central calculando-se o número de trofozoítos/mL.

Os estudos de aderência foram realizados em placas de 96 poços. Em cada poço foi inoculado 5×10^5 células em meio de cultura fresco e na ausência (controlo) ou presença de lavados intestinais e de soro de animais imunizados e não imunizados.

Os ensaios foram realizados em duplicado e a placa foi incubada a 37 °C durante 2 h. Terminado este tempo de incubação, os sobrenadante, contendo as células não aderentes, foram transferidos para eppendorfs e a cada poço foi adicionado 200 µL de PBS estéril 1x. A placa foi colocada em banho de gelo para desaderir os trofozoítos aderentes durante 20 minutos. Os trofozoítos aderentes e não aderentes foram contados câmara de Neubauer como descrito anteriormente, mas utilizando-se sómente 2 µL de formalina 10 %.

III. Resultados & Discussão

I. Optimização e caracterização das nanopartículas

I.1. Efeito do tipo de sal sulfato no consumo de quitosano durante a preparação das NPs

Foram produzidas nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio (NPs Na) e quitosano/sulfato de alumínio (NPs Al), recorrendo a agitação com o ultraturax. A percentagem de quitosano consumido na obtenção das NPs é apresentado no gráfico da figura III.1. Pode verificar-se que as nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio consomem uma maior percentagem de quitosano, cerca de 70 % durante a preparação quando o consumo do mesmo polímero é comparado com as nanopartículas de quitosano/ sulfato de alumínio (60 %).

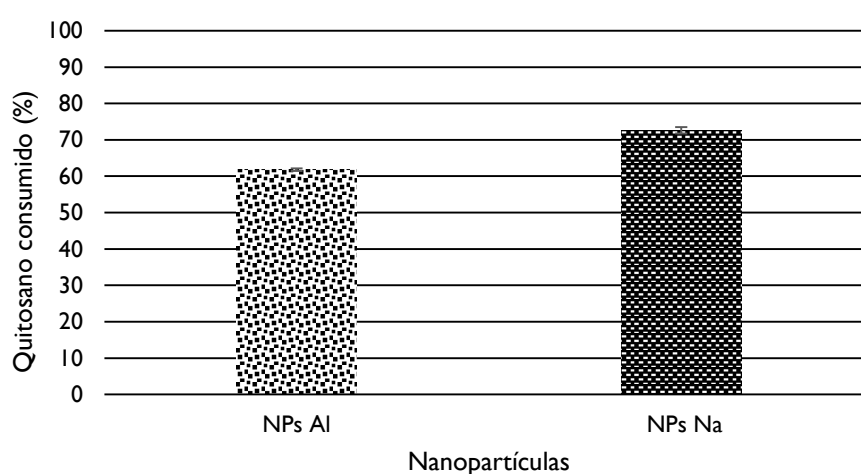


Figura III.1- Consumo médio de quitosano pelas nanopartículas produzidas com ultraturax à velocidade máxima (velocidade 10). A quantificação do quitosano foi feita pelo método colorimétrico do “Cibacron Brilliant Red 3-B-A dye binding”. Os resultados apresentados representam o valor médio de 3 lotes de NPs independentes.

No caso da adição de sulfato de sódio isso resulta de uma concentração em solução maior de iões SO_4^{2-} (0,002201 moles), exactamente os iões que são usados para fazer a ligação entre as moléculas do polímero, menos iões sulfato, significa menos possibilidade de ligar mais moléculas de quitosano. Como no caso das nanopartículas de quitosano/ sulfato de alumínio, os iões SO_4^{2-} em solução são menos, não ligando ao quitosano e ficando mais quitosano livre.

Podíamos ter optado por aumentar a concentração de SO_4^{2-} aumentando a concentração de sulfato de alumínio usada, optámos por não o fazer dado que o método já tinha sido

otimizado anteriormente no nosso laboratório com o objectivo de ter uma suspensão fisicamente estável.

1.2. Efeito do tipo de agitação no consumo de quitosano durante a preparação das NPs

No seguimento da experiência anterior, seleccionámos o método de preparação que utilizava a solução de sulfato de sódio, com o objectivo de avaliar se o modo de agitação da solução, durante a adição do agente “cross-link” poderia ou não influenciar o consumo de quitosano na formação das nanopartículas. Assim, o consumo de quitosano foi determinado para nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio produzidas com recurso a agitação com o ultraturax ou com o vórtex (Figura III.2). Observámos que as nanopartículas produzidas pelo vórtex resultou num consumo mais elevado de quitosano por parte das nanopartículas, aproximadamente de 100 %.

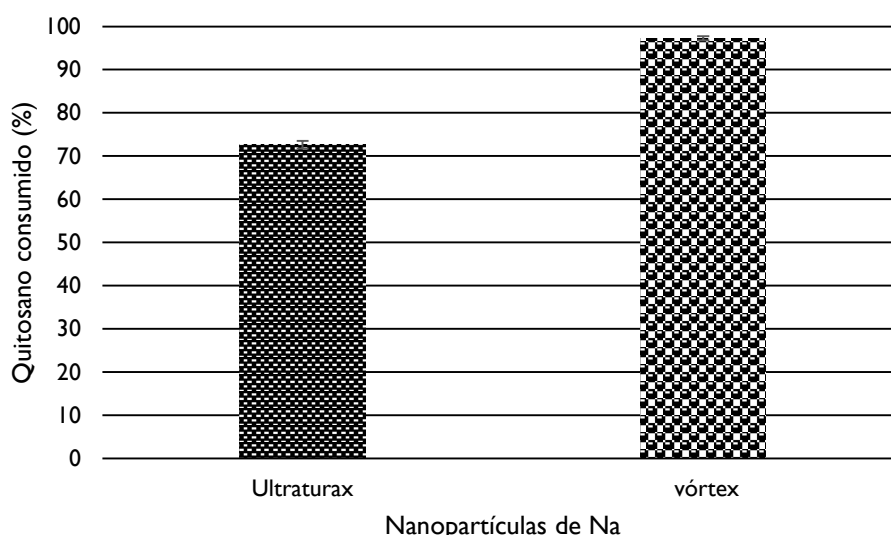


Figura III.2- Consumo médio de quitosano pelas nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio produzidas com ultraturax à velocidade máxima (velocidade 10) e com vórtex à velocidade máxima. A quantificação foi feita pelo método colorimétrico do “Cibacron Brilliant Red 3-B-A dye binding”. Os resultados apresentados representam a média dos resultados obtidos com 3 lotes independentes de NPs.

1.3. Caracterização de nanopartículas não revestidas e após o seu revestimento com alginato de sódio

As nanopartículas produzidas no vórtex com uma concentração de quitosano de 0,1 % foram caracterizadas tendo em conta o tamanho, potencial zeta e índice de polidispersão de

nanopartículas (Tabela III.I). Foram avaliadas nanopartículas de quitosano revestidas com alginato e nanopartículas não revestidas. Podendo observar-se que as nanopartículas não revestidas tem tamanhos mais pequenos e um potencial zeta positivo, enquanto as nanopartículas revestidas com alginato são maiores e possuem um potencial zeta negativo.

O quitosano é um polímero com carga positiva, conferindo às nanopartículas não revestidas um potencial zeta positivo. O alginato de sódio com o qual as nanopartículas são revestidas tem uma carga negativa, permitindo a sua ligação ao quitosano e fazendo com que estas passem a ter carga negativa também, pois é o alginato de sódio que fica à superfície das nanopartículas. No que respeita ao tamanho observa-se um aumento quando estas são revestidas pelo alginato de sódio, o que se compreende pois acrescentando o alginato de sódio é formada uma camada exterior, além disso, o revestimento conduz a uma suspensão fisicamente mais instável, porque o potencial zeta das NPs (após adição de Ca^{2+}) tende a aproximar-se de zero. Assim o tamanho observado pode não ser das NPs por si só, mas ser concerteza devido à presença de mais aglomerados.

Tabela III.I- Medições de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter).

Características	Tamanho (nm) Média ± SD	Índice de Polidispersão Média ± SD	Potencial Zeta Média ± SD
Nanopartículas de quitosano (n=3)	843,4 ± 14,19	0,1614 ± 0,0063	17,98 ± 0,96
Nanopartículas de quitosano revestidas com alginato (n=3)	1825,8 ± 33,72	0,2991 ± 0,0625	-26,55 ± 5,09

1.4. Influência da concentração de quitosano no tamanho das nanopartículas

Ao obter estes resultados fomos tentar otimizar as nanopartículas de forma a melhorar as suas características. Com o intuito de diminuir o tamanho das nanopartículas fomos verificar se ao diminuir a concentração de quitosano de 0,1 % para 0,05 %, e segundo o mesmo método (agitação com vórtex), conseguimos obter tamanhos de nanopartículas

mais reduzidos. Foram produzidas nanopartículas com concentrações de quitosano de 0,1 % e de 0,05 % mas não houve redução do tamanho das nanopartículas, aliás aconteceu o contrário. Nas medições obtiveram-se tamanhos médios de nanopartículas produzidas com 0,1 % de quitosano de 843,4 nm e nanopartículas produzidas com 0,05 % de quitosano de 822 nm, ou seja, nanopartículas produzidas com uma maior concentração de quitosano originaram nanopartículas com menor tamanho. O seu índice de polidispersão das nanopartículas produzidas com 0,05 % de quitosano também foi mais elevado, o que indica que existe uma maior variedade nos tamanhos das nanopartículas, a “população” não é tão uniforme. As medições foram feitas após a ressuspensão das nanopartículas e estão apresentadas na tabela III.2.

Tabela III.2- Medições de tamanho e índice de polidispersão no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter).

Características Nanopartículas	Tamanho (nm) Média ± SD	Índice de Polidispersão Média ± SD
Nanopartículas com 0,1 % de quitosano (n=3)	843,4 ± 14,19	0,1614 ± 0,0063
Nanopartículas com 0,05 % de quitosano (n=4)	822 ± 211	0,391 ± 0,088

I.5. Influência da utilização de Tween 80 no tamanho das nanopartículas

Atendendo aos resultados obtidos, foi mantida a concentração de quitosano de 0,1 % para a produção das nanopartículas, seguindo-se outra abordagem para tentar diminuir o tamanho das nanopartículas. Foram produzidas nanopartículas com Tween 80 a 0,1 %, que é um tensoativo. No estudo comparativo entre nanopartículas com e sem Tween 80 observou-se que o tamanho médio das nanopartículas com Tween 80 era inferior ao das nanopartículas sem Tween 80, mas o seu índice de polidispersão foi bem mais elevado o que significa que existe uma gama de tamanhos mais ampla com este tipo de nanopartículas. Apesar de com a utilização do Tween 80 as nanopartículas terem tamanhos mais pequenos, a produção destas nanopartículas não se concretizou uma vez que se verificaram dificuldades em quantificar a proteína encapsulada, o método de quantificação utilizado é sensível ao Tween 80.

As nanopartículas foram preparadas todas no vórtex e medidas após ressuspensas em água. Na tabela III.3 estão apresentados os resultados obtidos para as nanopartículas com e sem o Tween 80, podendo observar-se que a utilização deste componente diminui claramente o tamanho das nanopartículas.

Tabela III.3- Medições de tamanho e índice de polidispersão no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter).

Características Nanopartículas	Tamanho (nm) Média ± SD	Índice de Polidispersão Média ± SD
Nanopartículas sem Tween 80 (n=3)	843,4 ± 14,19	0,1614 ± 0,0063
Nanopartículas com Tween 80 (n=3)	422 ± 63,73	0,2448 ± 0,1423

1.6. Estudo da variação da concentração de CaCl_2 no potencial zeta das nanopartículas revestidas com alginato de sódio

Com vista a aumentar o potencial zeta das nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio revestidas com alginato de sódio, foi feito um estudo para verificar se o aumento da concentração de cloreto de cálcio utilizada durante o revestimento, para fazer o “cross-link” tinha influência. Utilizou-se primeiramente uma concentração de 18 mM de CaCl_2 , mas para ver se era possível aumentar o potencial zeta das nanopartículas (torná-las positivas) testaram-se igualmente concentrações mais elevadas. Foram testadas concentrações de cloreto de cálcio entre os 18 mM e os 1500 mM (Tabela III.4), o que se observou foi que ao aumentar a concentração do íon Ca^{2+} o potencial zeta das nanopartículas aumentava, mas também as tornava cada vez mais intáveis e logo após a adição do cloreto as nanopartículas agregavam e floculavam.

Os resultados de potencial zeta para cada uma das concentrações testadas encontram-se na tabela III.4. Observou-se que ao aumentar a concentração havia um aumento do potencial zeta das nanopartículas. No entanto, a suspensão das nanopartículas tornava-se demasiado instável e logo após a adição de CaCl_2 agregavam e depositavam no fundo do tubo.

Assim, a opção foi manter a concentração do cloreto de cálcio a 18 mM e continuar com o potencial mais negativo, mas com nanopartículas que não têm a tendência para agregar e flocular ainda durante o seu processo de produção.

Tabela III.4- Efeito do aumento da concentração de iões Ca^{2+} no potencial zeta das NPs revestidas com alginato de sódio. Média dos valores de potencial zeta no Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter) (n=3).

Concentração de CaCl_2 (mM)	Potencial zeta (mV)
18	-22,77
30	-21,29
40	-22,35
50	-19,93
*200	-8,68
*400	-4,09
*600	1,66
*800	2,85
*1200	8,49
*1500	7,67

*condições em que se verifica imediata agregação das nanopartículas

1.7. Estudo da eficiência de encapsulamento de proteínas modelo a diferentes temperaturas

Para estudar a eficácia de encapsulamento de diversas proteínas modelo (BSA, ovalbumina, mioglobina, lisozima, α -caseína) nas nanopartículas de quitosano/sulfato de alumínio e quitosano/sulfato de sódio utilizaram-se várias proteínas modelo com uma concentração de 0,025 % e testaram-se duas temperaturas diferentes: as nanopartículas produzidas à temperatura ambiente (20 °C) e em gelo (4 °C). Os resultados obtidos estão representados no gráfico da figura III.3.

Da observação directa dos resultados representados em gráfico (Figura III.3) podemos concluir que, de uma forma geral e independentemente da temperatura a que foram feitas as nanopartículas (20 °C ou 4 °C), a eficiência de encapsulamento é maior nas nanopartículas preparadas com o sulfato de alumínio.

Existem 2 proteínas que são excepção, a α -caseína e a lisozima, as quais não apresentam diferenças significativas da sua eficiência de encapsulamento, quer consideremos o tipo de nanopartículas, quer se considere a temperatura de preparação das mesmas. Por outro lado, é curioso de observar que a lisozima é a proteína com a menor eficiência de encapsulação e a α -caseína é a proteína com maior eficiência de encapsulamento a ambas as temperaturas. Pode também observar-se que em gelo a eficiência de encapsulamento das proteínas mioglobina e BSA nas NPs Al tende a ser superior do que à temperatura ambiente. Em relação às NPs Na

a eficiência de encapsulamento das proteínas modelo foi praticamente idêntica a ambas as temperaturas estudadas.

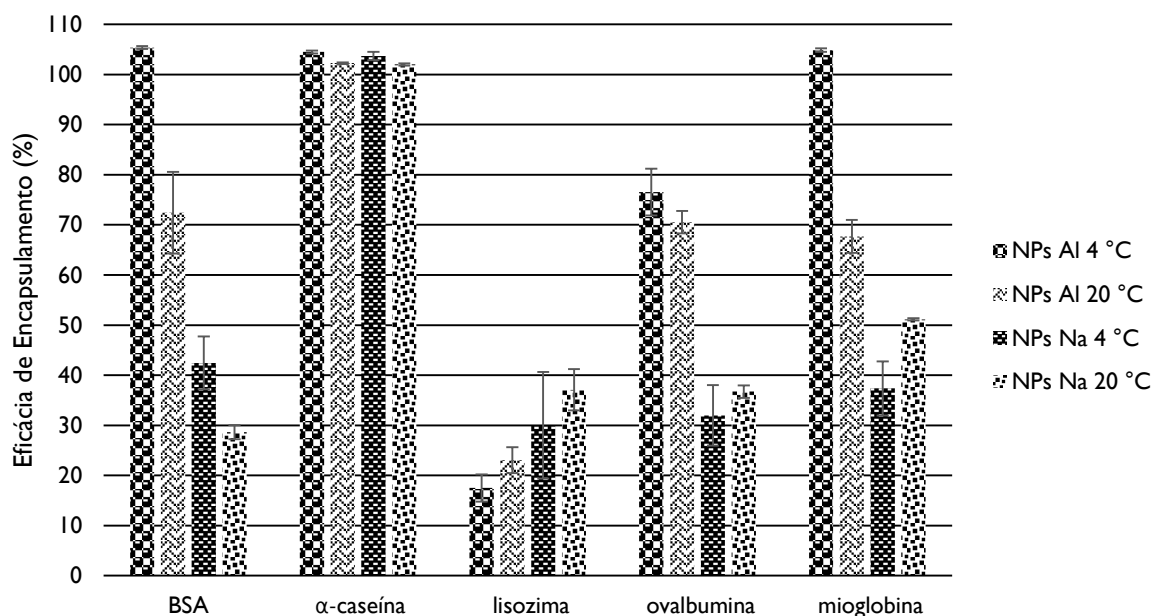


Figura III.3- Eficácia de encapsulamento de proteínas, em nanopartículas de quitosano/ sulfato de alumínio e quitosano/ sulfato de sódio em gelo (4 °C) e à temperatura ambiente (20 °C). A proteína foi medida através do método do micro BCA (n=3).

Face a estes resultados as nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio prosseguiram sendo produzidas à temperatura ambiente. Todas estas proteínas utilizadas têm um ponto isoelétrico próximo, e verificou-se na bibliografia encontrada que o ponto isoelétrico do antígeno β-giardina é de 5.5 (PALM, 2003). Este dado é importante pois este ponto isoelétrico é próximo do da BSA pI=4.8, assim era espectável que o comportamento da proteína β-giardina quando encapsulada fosse o mesmo ou muito próximo do comportamento da BSA, sendo assim com uma eficácia de encapsulamento próxima dos 30 %, uma vez que o encapsulamento da BSA foi de 28 %. Não é ainda conhecida a estrutura do antígeno β-giardina, não sendo possível comparar com as estruturas das proteínas utilizadas como modelo no estudo.

1.8. Efeito da concentração da proteína na solução do “cross-link” na eficiência de encapsulação nas NPs

É conhecido da literatura científica, que a eficiência de encapsulamento é possível de ser otimizada, tendo como objectivo conseguir uma eficiência mais elevada. Com este objectivo escolheu-se a BSA, cuja eficiência de encapsulamento foi consideravelmente inferior

nas NPs feitas com sulfato de sódio. Pretendia-se assim perceber se era possível aumentar os seus valores para valores próximos dos observados com as NPs Al. Neste sentido o trabalho prosseguiu utilizando como proteína modelo a BSA e as nanopartículas de quitosano sulfato de sódio. Produziram-se nanopartículas com três concentrações mais baixas de proteína na solução de “cross-link”, 0,0125 %, 0,009375 % e 0,00625 %. Os resultados obtidos (Figura III.4) demonstraram que diminuindo a concentração da proteína, a sua eficiência de encapsulamento tende a aumentar, tendo-se observado uma eficiência de encapsulamento de cerca de 60 % para a concentração de BSA na solução “cross-link” de 0,00625 %.

Para isso foram produzidas nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio com concentrações de BSA mais baixas, de 0,0125 %, 0,009375 % e 0,00625 %. Ao diminuir a concentração a eficácia de encapsulamento aumentou e obteve-se um resultado de eficácia de encapsulamento próximo de 60 % com a concentração de BSA mais baixa.

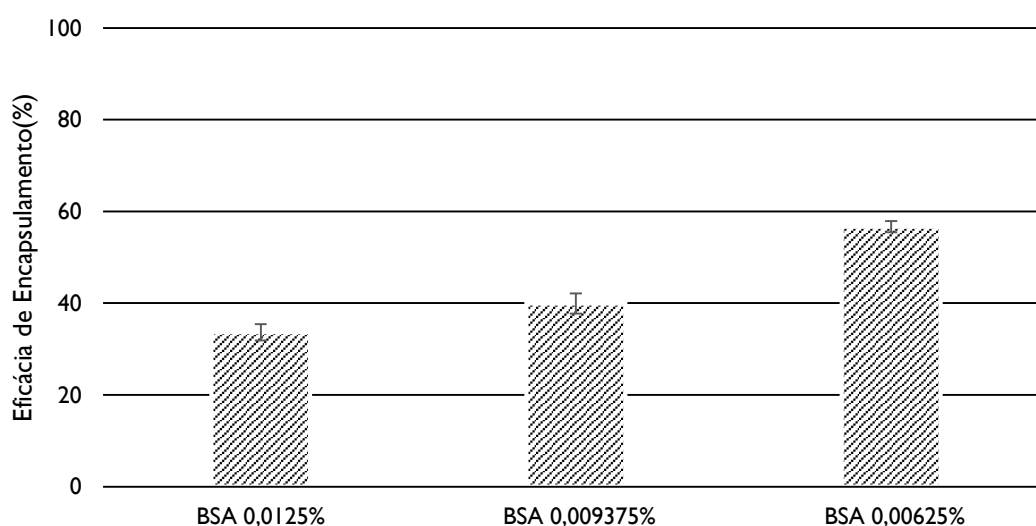


Figura III.4- Eficácia de encapsulamento de BSA, utilizando três concentrações diferentes, em nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio à temperatura ambiente através do método do micro BCA. Os resultados representam a média de valores encontrados em 3 lotes de NPs produzidos de forma independente.

1.9. Encapsulamento do antígeno β -giardina

Perante o resultado obtido decidiu-se fazer o encapsulamento do antígeno β -giardina com a menor concentração testada para a proteína BSA (0,00625 %). A eficiência de encapsulamento do antígeno β -giardina foi determinado nas nanopartículas produzidas para

aos estudos de vacinação. Assim, a avaliação foi feita quer nas nanopartículas revestidas (administração oral), quer nas NPs não revestidas (administração subcutânea) (Figura III.5). Como se pode verificar, o resultado da eficácia de encapsulamento para o antígeno β -giardina foi mais elevado do que para a proteína modelo na mesma concentração. O antígeno β -giardina obteve uma eficácia de encapsulamento de 100 %.

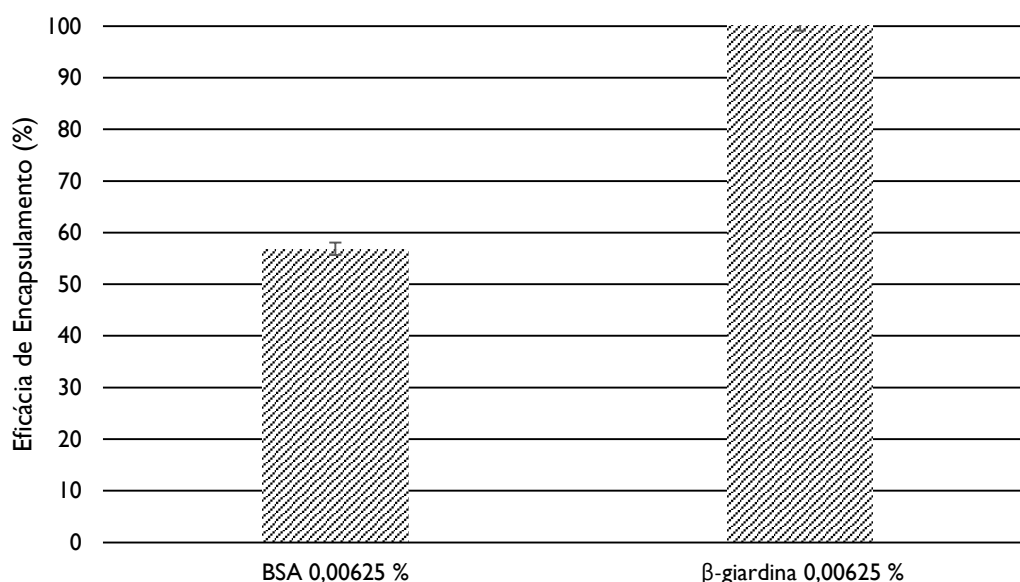


Figura III.5- Eficácia de encapsulamento da BSA e de β -giardina na concentração de 0,00625 %, em nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio à temperatura ambiente através do método do micro BCA. Os resultados de encapsulamento da BSA representam a média dos valores encontrados em 3 lotes de NPs produzidos de forma independente e os resultados de encapsulamento de β -giardina representam a média dos valores dos lotes utilizados de NPs para os estudos de imunização (n= 5).

2. Estudos de imunização

Nesta fase do projeto, as nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio carregadas com o antígeno β -giardina foram testadas em murganhos fêmea C57BL/6J com oito semanas. No dia 0 foi administrado pela via ao nível subcutânea uma formulação de nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio (não revestidas) carregadas com o antígeno β -giardina modificado. Seguiram-se mais três reforços orais com nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio revestidas com alginato de sódio e um reforço final subcutâneo com uma formulação

semelhante à do dia 0. Passada uma semana do último reforço, os animais foram sacrificados e foram recolhidas as diversas amostras, nomeadamente, lavagens intestinais, lavagens vaginais, soro e fezes de forma a testar a eficiência da vacina.

Foram então quantificados os anticorpos através do método de ELISA.

2.1. IgG no soro

O soro foi recolhido dos 5 murganhos imunizados ao longo do estudo *in vivo*, num período de 59 dias. Houve três recolhas de soro, primeiramente ao 14^o dia após o início do estudo, ou seja, após a primeira imunização. Ao 43^o dia, após a primeira imunização e dois reforços orais e no final do estudo, no dia 59. As amostras de soro recolhidas foram tratadas como descrito no capítulo anterior e guardadas a -80 °C. A quantificação da IgG no soro foi realizada por ELISA. Na figura III.6 estão apresentados os resultados dos títulos médios de IgG obtidos nos murganhos imunizados. Observaram-se títulos elevados a partir do dia 14, verificando-se apenas um ligeiro aumento dos títulos ao longo do tempo. Na realidade esse aumento foi observado apenas em 2 dos 5 animais imunizados (Figura III.7) aumentando ao longo do decorrer das imunizações.

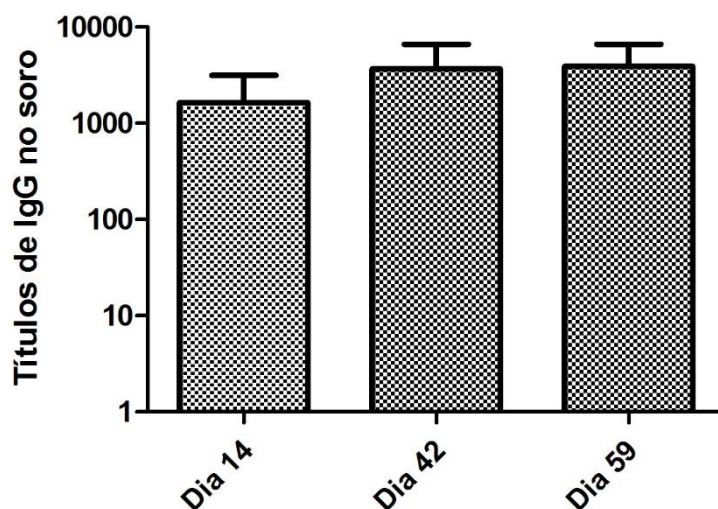


Figura III.6- Títulos de anti-β-giardina IgG no soro dos animais imunizados ao longo do tempo de estudo quantificados através do método de ELISA (n=5).

Na figura III.7 estão representados os perfis de cada um dos murganhos imunizados relativamente aos títulos de IgG no soro ao longo do tempo. Observa-se que cada animal têm uma evolução diferente, embora no geral os níveis de IgG aumentem.

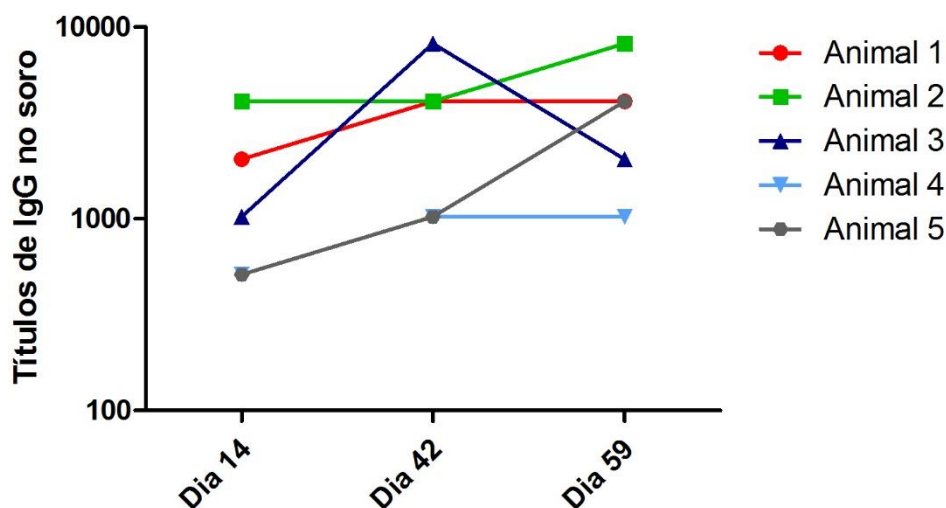


Figura III.7- Níveis dos títulos de IgG anti- β -giardina no soro de cada um dos animais imunizados ao longo do estudo (n=5).

Com o objectivo de avaliar o tipo de resposta imune desenvolvida pelos animais que respondem à vacina, foram também quantificados dois isótipos da IgG, nomeadamente IgG1 e IgG2c (Figura III.8). Todos os animais apresentam títulos elevados de IgG1 no soro recolhido no último dia do estudo de imunização (dia 59). Apenas dois desses animais imunizados também apresentam títulos, embora mais baixos, de IgG2c.

Podemos afirmar que os animais em estudo desenvolveram uma resposta imune do tipo Th2. No entanto, podemos ainda afirmar que dentro do grupo, alguns animais parecem estar a desenvolver uma resposta mista Th1/Th2.

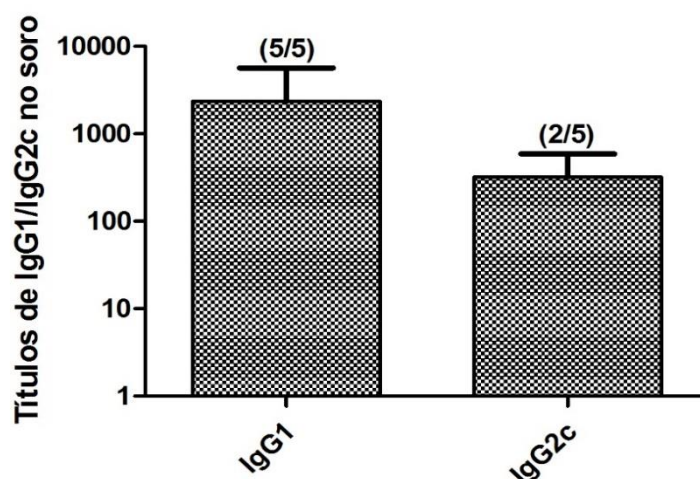


Figura III.8- Títulos de isótipos de IgG1 e IgG2c no soro dos animais imunizados no final do estudo in vivo (n=5).

2.2. IgG nas mucosas

Ao nível da mucosa também se quantificou a IgG, através do método de ELISA, nomeadamente nas lavagens intestinais, lavagens vaginais e nas fezes. Embora não sendo o anticorpo mais importante ao nível das mucosas, a IgG está normalmente presente. A comunidade científica acredita que quando existem títulos elevado no sangue, esta imunoglobulina passa para as mucosas por um processo denominado “transudation”, que não é mais do que a passagem de uma substância ou fluido através de uma membrana ou tecido explicada por um gradiente de pressão osmótica ou diferenças de pressão hidrostática.

As fezes foram recolhidas ao longo do estudo sendo apresentados resultados do dia 14, quando os murganhos já tinham sido imunizados a nível subcutâneo, do dia 48, após a imunização e três reforços orais e no dia 59 no final do estudo de imunização.

As lavagens intestinais foram recolhidas no último dia do estudo, após a imunização e os reforços orais e subcutâneo e foram utilizadas para quantificar a IgG.

As lavagens vaginais utilizadas para quantificar a IgG foram recolhidas no último dia do estudo, ao dia 59, após a imunização e os três reforços orais e o reforço subcutâneo.

Todas estas amostras foram tratadas conforme o procedimento descrito no capítulo anterior.

Os resultados de IgG na mucosa estão apresentados em absorvância dado que os valores são muito baixos.

- **Fezes**

Em relação às amostras de fezes recolhidas observa-se na figura 9 que os valores são muito baixos e idênticos nos 3 dias estudados tanto em animais imunizados como controlo.

Dado os valores observados pode dizer-se que não há IgG nas fezes, ou a existir são níveis demasiado baixos, para os quais a técnica utilizada para detecção não têm sensibilidade.

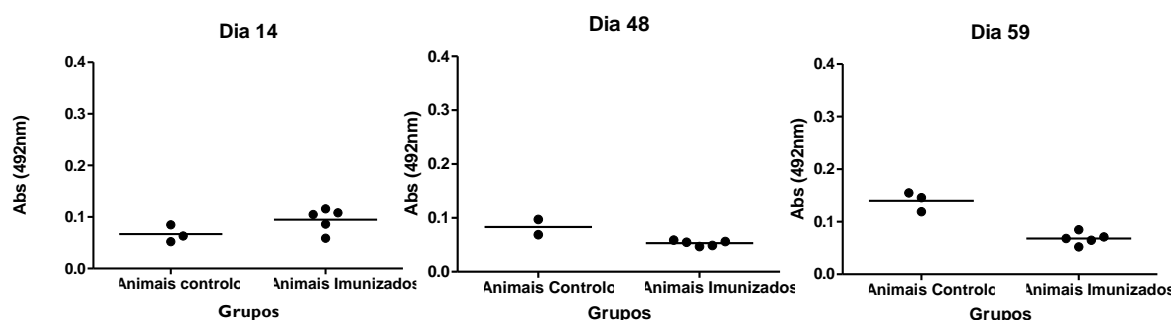


Figura III.9- Absorvâncias obtidas das amostras de fezes dos animais em estudo relativamente à IgG, recolhidas em três tempos diferentes (n=5).

- **Lavagens Intestinais**

Os resultados obtidos com as lavagens intestinais confirmam a dificuldade em detectar esta imunoglobulina na mucosa. Os valores elevados de absorvância no grupo dos animais imunizados apresenta a mesma ordem de grandeza que os valores observados para as amostras dos animais controlo (Figura III.10).

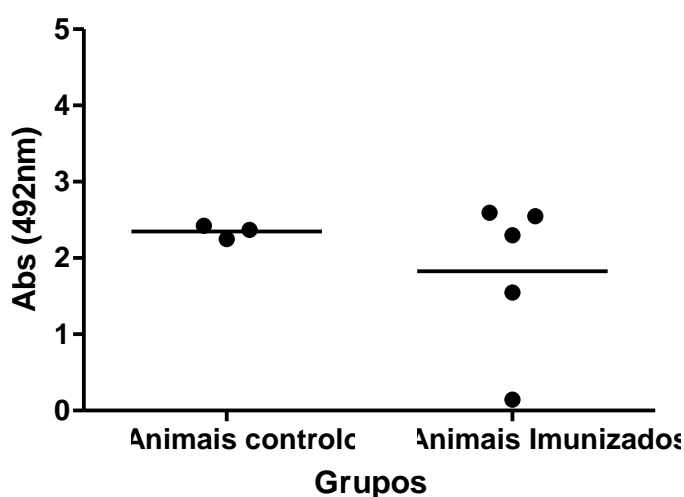


Figura III.10- Absorvâncias obtidas das amostras de lavagens intestinais dos animais em estudo relativamente à IgG (n=5).

Na realidade estes valores elevados poder ser explicados por eventuais reacções cruzadas de anticorpos ou de outros compostos que estarão presentes nestas lavagens e sobre os quais não temos controlo.

- **Lavagens Vaginais**

Ao nível das lavagens vaginais a média de valores dos animais imunizados não é estatisticamente diferente do grupo controlo. No entanto parece existir 1 animal que apresenta IgG específica na mucosa (Figura III.11).

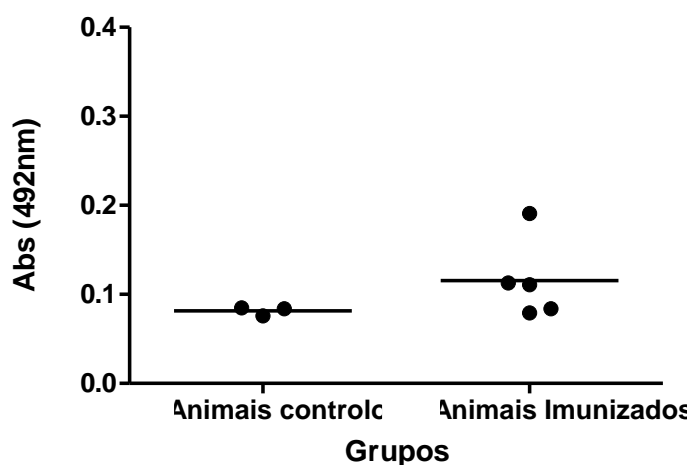


Figura III.11 - Absorvâncias obtidas das amostras de lavagens vaginais dos animais em estudo relativamente à IgG (n=5).

2.3. IgA total nos fluídos biológicos

A IgA secretora é o anticorpo mais abundante nas mucosas e por esse motivo o que desempenhará o papel mais importante nos mecanismos de defesa existentes nas mucosas (ECKMANN, 2003). A IgA total foi quantificada (ng/mL) em todos os fluídos biológicos nomeadamente soro, lavagens intestinais e vaginais e fezes de animais controlo e imunizados. Observou-se que os animais imunizados possuem em todos os fluídos biológicos analisados uma maior concentração de IgA total (Figura III.12) semelhante ao grupo controlo.

Esta determinação foi importante porque o efeito destes extractos numa cultura de parasitas foi igualmente avaliado. Assim sabe-se que os extractos usados nos estudos *in vitro* com culturas de *Giardia* eram extractos com concentrações elevadas de IgA secretora.

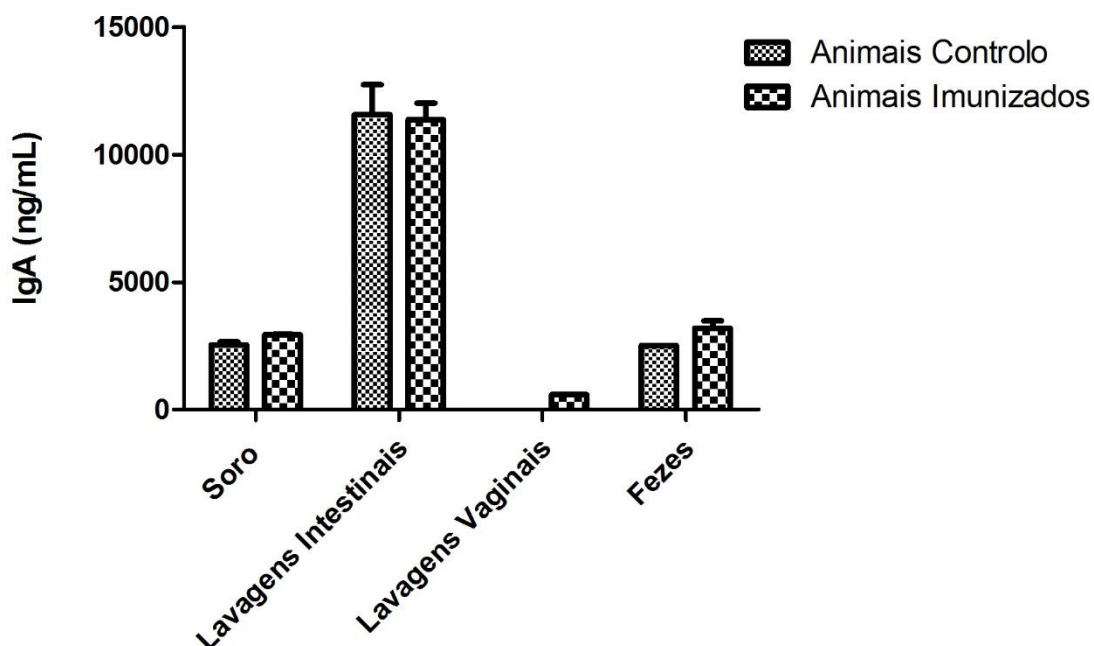


Figura III.12- Concentração de IgA total nos fluidos biológicos dos animais controlo e imunizados (n=5).

2.4. IgA específica nas mucosas

Ao nível da mucosa quantificou-se a IgA específica, através do método de ELISA, nomeadamente nas lavagens intestinais, lavagens vaginais e nas fezes. As amostras foram recolhidas como referenciado no capítulo anterior e foram quantificadas pelo método de ELISA. Nas lavagens intestinais, lavagens vaginais e nas fezes observou-se valores pouco conclusivos, não foi possível detectar nas mucosas IgA específica anti- β -giardina. Os resultados de IgA na mucosa estão apresentados em absorvância pois os valores não são muito elevados, mas é importante para o trabalho verificar estes dados, dado ser a imunoglobulina existente nas mucosas (Figuras III.13 e III.14).

- **Mucosa intestinal (fezes e lavagens intestinais)**

As fezes foram recolhidas ao longo do estudo sendo apresentados resultados neste caso resultados do dia 48 do estudo *in vivo*, após a imunização e três reforços orais. As lavagens intestinais foram recolhidas no dia do sacrifício dos animais, ao dia 59 (Figura III.13).

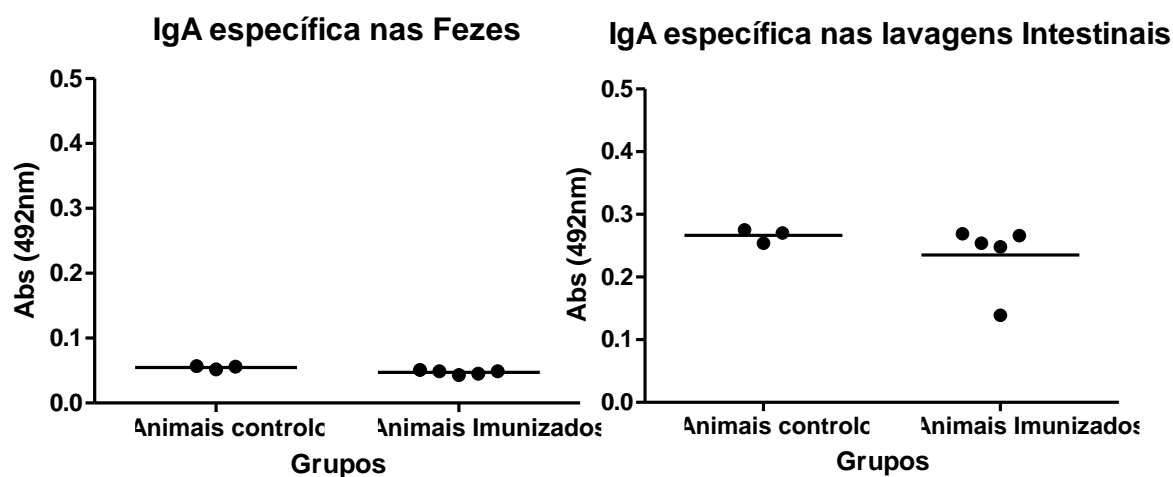


Figura III.13- Absorvâncias obtidas das amostras de fezes e lavagens intestinais dos animais em estudo relativamente à IgA específica (n=5).

- **Mucosa Vaginal (Lavagens Vaginais)**

As lavagens vaginais utilizadas para quantificar a IgA específica anti- β -giardina foram recolhidas no dia 36 do estudo, após a imunização e dois reforços orais (Figura III.14).

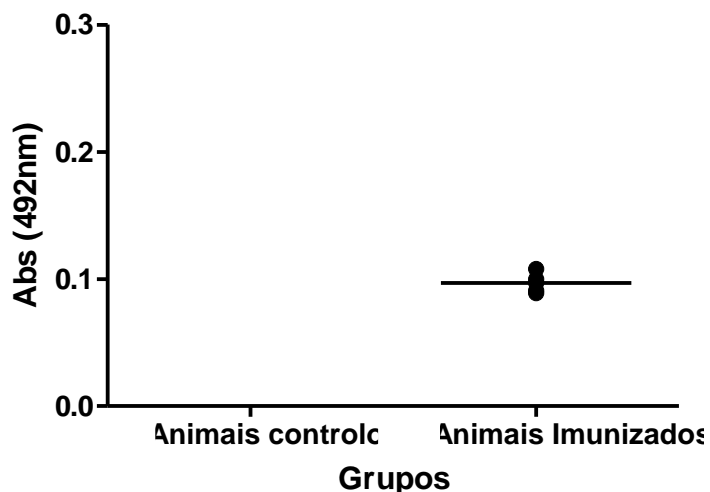


Figura III.14- Absorvâncias obtidas das amostras de lavagens vaginais dos animais em estudo relativamente à IgA específica (n=5).

O método utilizado para determinar a IgA específica (anti- β -giardina) não parece ser suficientemente sensível (animais controlo apresentam valores elevados) e portanto não nos foi possível aferir se efectivamente existe ou não IgA específica. De qualquer modo, a existir a concentração é baixa.

3. Estudos *in vitro* com culturas de *Giardia lamblia* (Clone WBC6)

Foram realizados estudos de inibição da aderência dos trofozoítos quando em contacto com amostras de lavagens intestinais e soro recolhidos dos animais controlo e imunizados do estudo *in vivo*. Essas amostras foram recolhidas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ como já descrito no capítulo anterior, de forma a permitir a sua posterior utilização.

Os resultados obtidos dos testes de inibição da aderência dos trofozoítos na presença das lavagens intestinais encontram-se representados na Figura III.15. Verificou-se que o número de parasitas aderentes diminui na presença das lavagens intestinais dos animais imunizados, expostos ao antigénio β -giardina encapsulado (animais imunizados).

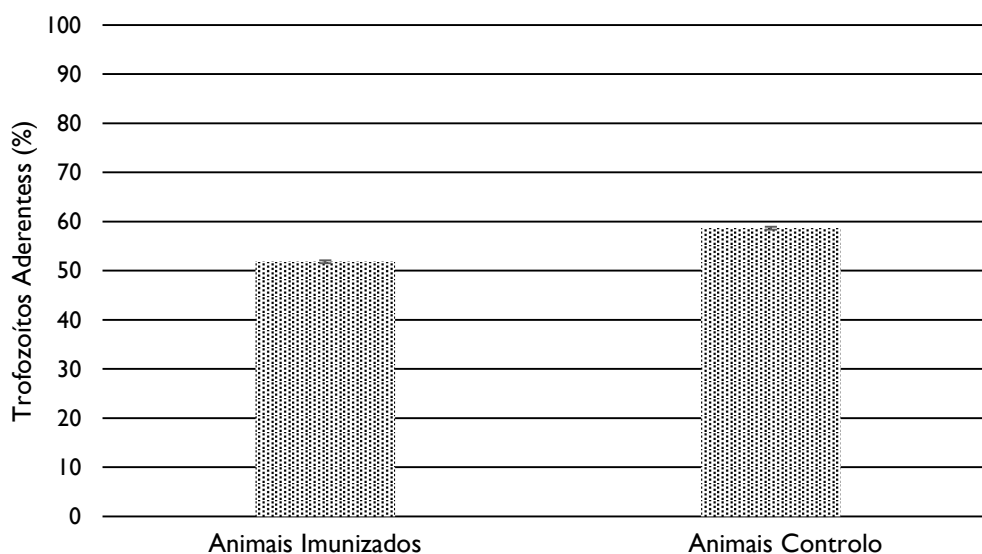


Figura III.15- Número de trofozoítos aderentes na presença das lavagens intestinais obtidas de animais controlo e animais imunizados (n= 3).

Em relação aos ensaios na presença do soro de animais controlo e animais imunizados (Figura III.16) verificou-se um aumento no número de trofozoítos aderentes, mas nada de significativo.

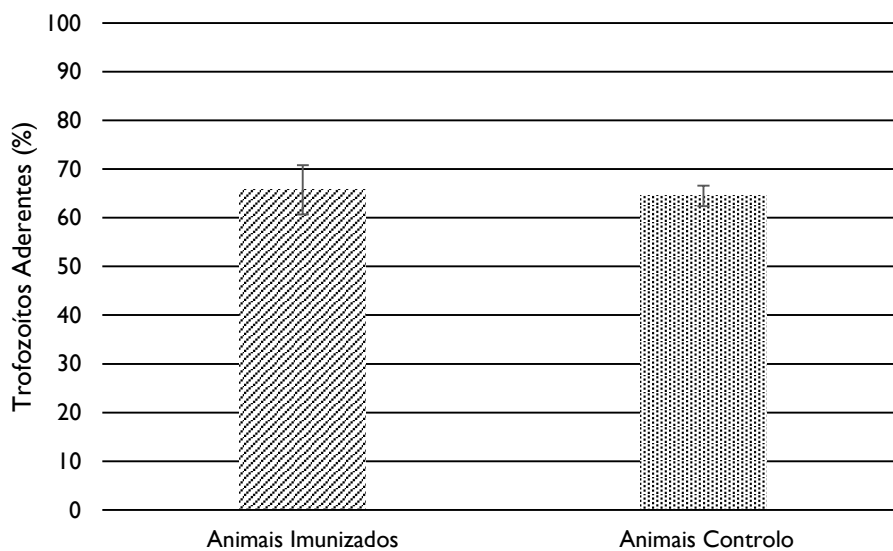


Figura III.16- Número de trofozoítos aderentes na presença de soro obtido de animais controlo e animais imunizados (n= 3).

IV. Conclusões

Giardia lamblia é o parasita intestinal mais comum em todo mundo, provocando distúrbios intestinais como diarreia e síndrome de má absorção. Em crianças pode ter um impacto fortemente negativo devido à fase de desenvolvimento.

Este protozoário intestinal é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como um problema de saúde pública. Na sua fase de quisto pode permanecer viável longos períodos de tempo no ambiente, em especial na água. Um baixo número de quistos (1 a 10), os quais podem chegar ao nosso organismo através da água ingerida provocam a infeção. Apesar dos tratamentos que normalmente se fazem às águas de rede pública, verifica-se muitas vezes a presença do parasita. Este parasita é muito resistente aos desinfetantes mais comumente utilizados, e em países pouco desenvolvidos, com falta de higiene e saneamento básico a probabilidade de contrair giardíase está bastante aumentada.

Embora seja um problema de saúde pública não existe nenhuma vacina que previna a infeção no homem. A nível veterinário existe uma vacina inactivada contra a *Giardia*, a *GiardiaVax*, constituída por lisados de células do parasita. Outras duas vacinas foram mais recentemente desenvolvidas. Uma utiliza como antigénio proteínas de superfície variável, obtidas através de trofozoítos recombinantes (RIVERO *et al.*, 2010), outra em que o antigénio utilizado, é a α -giardina, foi produzida num vetor vivo atenuado de *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* (JENIKOVA, *et al.*, 2011).

Com este projeto pretendeu-se desenvolver uma vacina oral com nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio revestidas com alginato. Estas nanopartículas foram “desenhadas” de modo a desempenharem duas funções, por um lado proteger o antigénio do ambiente próprio do tubo digestivo caracterizado pelo pH baixo (estômago) e pela presença de proteases capazes de degradarem o antigénio. O antigénio seleccionado foi o β -giardina, este antigénio encontra-se ao nível do disco adesivo da *Giardia*, mais precisamente na zona dorsal, havendo indícios de este ser expresso em toda a superfície do disco (FELIZIANI, *et al.*, 2011; MACARISIN, *et al.*, 2012). Este antigénio foi ligado ao H-tag de forma a aumentar a sua imunogenicidade e dessa forma tornar a resposta imune mais eficaz.

Na primeira fase do trabalho prepararam-se as nanopartículas e procedeu-se à sua caracterização. Inicialmente tínhamos dois tipos de nanopartículas a ser produzidas com o ultraturax, nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio e quitosano/ sulfato de alumínio. Primeiramente, verificou-se se o quitosano utilizado para a sua produção das nanopartículas era ou não consumido. Os resultados obtidos mostraram uma maior percentagem de

quitosano consumido pelas nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio (73 %). Com o intuito de melhorar o consumo de quitosano, evitando desperdício de material e deixando as nanopartículas com maior percentagem de quitosano foram produzidas as nanopartículas com a ajuda do vortéx na sua velocidade máxima. Estas nanopartículas tiveram um consumo de quitosano superior (97 %). Estes resultados vêm confirmar resultados anteriores já realizados no grupo. Com estes resultados optou-se por produzir as nanopartículas de quitosano/sulfato de sódio com o vortéx na velocidade máxima.

De seguida, continuando-se na caracterização, as nanopartículas foram medidas no *Delsa™ Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter)* em relação ao seu tamanho e potencial zeta. As nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio não revestidas tiveram tamanhos em média inferiores às nanopartículas revestidas com alginato de sódio. O potencial zeta das nanopartículas de quitosano é positivo, passando a negativo após o revestimento com alginato de sódio. Esta diferença de valores entre partículas revestidas e não revestidas está de acordo com o que se esperava, tendo em conta resultados já obtidos pelo grupo de trabalho e trabalhos publicados encontrados em relação a este tema.

Após a optimização e caracterização das nanopartículas a melhor solução encontrada foi produzir nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio no vórtex à velocidade máxima, com a temperatura ambiente.

Com o final destas otimizações procedeu-se então à produção das nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio com o antígeno do parasita *Giardia lamblia*, β -giardina. Foi então utilizada uma concentração do antígeno de 0,00625 % e as nanopartículas foram desenvolvidas por forma a serem administradas aos animais no início da segunda fase do trabalho. Os resultados obtidos da eficiência de encapsulamento do antígeno foram bastante diferentes dos obtidos com a proteína modelo. A eficiência de encapsulamento deste antígeno foi de 100 %. Isto aconteceu com todas as nanopartículas produzidas com o antígeno encapsulado e que foram administradas aos animais. Este resultado tendo em conta os resultados obtidos com a proteína modelo não era esperado.

Finalizada a primeira parte do trabalho com a produção das nanopartículas carregadas com o antígeno β -giardina iniciou-se então a segunda fase deste trabalho. Nesta fase as nanopartículas produzidas foram administradas a murganhos fêmea C57BL/6J com oito

semanas. Neste estudo *in vivo*, pretendeu-se verificar se os animais desenvolviam uma resposta imunitária contra o antigénio, e dessa forma contra o parasita. Para isso, os animais foram imunizados segundo o esquema apresentado na figura II.1, primeiramente a nível subcutâneo com nanopartículas carregadas com o antigénio não revestidas e depois com três reforços orais com as nanopartículas carregadas com o antigénio e revestidas. Na imunização oral o revestimento das nanopartículas com alginato de sódio impede que estas sejam degradadas durante a sua passagem pelo estômago, pois o pH é de 1,2, extremamente ácido. Assim protegendo as nanopartículas asseguramos que estas cheguem intactas ao seu alvo no intestino delgado e que assim possam desenvolver a sua ação. Pretende-se que estas sejam internalizadas pelas placas de Peyer, e que depois produzam uma resposta imunitária ao nível da mucosa e também a nível sistémico produzindo anticorpos. Como está descrito os anticorpos que são produzidos nestes casos são as IgA e IgG e portanto foram estes dois anticorpos que foram pesquisados.

Ao longo do estudo *in vivo* foi quantificada a IgG no soro dos animais. Como é mostrado na secção dos resultados, houve produção de IgG pelos animais, e passado 14 dias após o início do estudo já os títulos eram elevados. Com o decorrer das imunizações observa-se que há um ligeiro aumento desses títulos, mas no fundo pode dizer-se que os animais responderam e produziram IgG e que com os reforços conseguiram manter os seus níveis no soro. Para isso ter acontecido, pode ter contribuído o facto de estes terem recebido os reforços orais ao longo do tempo. Também se verificou que os 5 animais imunizados têm perfis diferentes, ou seja, cada animal responde de forma diferente à imunização, mas todos eles produzem IgG ao longo do decorrer do estudo. Apenas num animal há uma diminuição da produção de IgG. Conclui-se, assim, que a nível sistémico houve uma imunização efetiva. Para saber que tipo de resposta foi produzida pelos animais, foram quantificados dois isótipos de IgG, IgG1 e IgG2c. Como é possível verificar, todos os animais produziram IgG1 e apenas dois produziram tanto IgG1 como IgG2c. Era de facto esperado que os animais produzissem IgG1, uma resposta do tipo Th2, mais indicada para combater infecções por parasitas e bactérias extracelulares. Neste trabalho o antigénio β -giardina pertence ao parasita *Giardia lamblia* que causa infeção aderindo às células epiteliais do intestino delgado. O IgG2c é produzido numa resposta do tipo Th1. Assim, dado os resultados obtidos pode afirmar-se que dois dos murganhos em estudo tiveram uma resposta imune (Th1/Th2) mais balanceada. Em Jenikova 2011, a vacina oral desenvolvida contra a *Giardia* com o antigénio α -giardina, produz apenas uma resposta Th1 ao contrário do

que acontece neste estudo. Dado o parasita se encontrar no lúmen intestinal e não no meio intracelular a resposta Th1 é a mais ajustada contra a *Giardia*.

Um dos principais objectivos deste trabalho era obter reposta imunitária ao nível da mucosa, principalmente ao nível da mucosa intestinal, dado que a vacina desenvolvida é oral e dado que o parasita se aloja no intestino. Ao longo do estudo *in vivo* foram recolhidas fezes e lavagens vaginais e no final do trabalho com o sacrifício dos animais foram feitas lavagens intestinais. Estas recolhas foram feitas de forma a quantificarem-se os anticorpos IgG e IgA específica anti- β -giardina.

A quantificação destes dois anticorpos específicos nas mucosas levou a resultados pouco claros.

Nas fezes dado os resultados obtidos para a IgG o que se retira é que não há diferenças entre os grupos, animais controlo e imunizados ao longo do tempo. Pode afirmar-se que não existe IgG nas fezes, assim como, IgA específica anti- β -giardina. Caso exista serão valores demasiado baixos e não detectáveis através do método utilizado.

Já nas lavagens intestinais não foi possível detetar nem IgG nem IgA específica anti- β -giardina. Os resultados não significam que não tenham sido produzidos anticorpos específicos, mas que provavelmente o método utilizado para a sua quantificação não foi o mais indicado. De facto, obtiveram-se absorvâncias elevadas para ambos os grupos de animais, imunizados e controlo, indicativo de que compostos presentes nas lavagens interferem com método de pesquisa de anticorpos. Existe também a possibilidade de haver reacções cruzadas entre anticorpos que também estão presentes nas lavagens intestinais. Estas indeterminações levam a resultados pouco conclusivos, não se podendo afirmar que houve produzam dos anticorpos específicos ou que não houve.

Na mucosa vaginal a IgG e a IgA específica anti- β -giardina também não foi possível determinar. Os valores obtidos na quantificação da IgG são praticamente iguais nos grupos controlo e imunizado. Em relação à IgA específica anti- β -giardina o método utilizado não parece ter sensibilidade para detectar os níveis deste anticorpo se estiverem a ser produzidos.

Também foi feita a pesquisa de IgA total nos fluídos biológicos, soro, lavagens intestinais, lavagens vaginais e fezes. A IgA total foi detetada em animais controlo e imunizados. Este anticorpo não é específico e foi produzido por todos os animais. No entanto, pode observar-se que em todos os fluídos biológicos não há uma maior concentração de IgA total

nos animais que foram imunizados e no intestino delgado a concentração de IgA total foi bem mais elevada do que em qualquer outro fluido biológico estudado. Foi importante caracterizar os extractos, nomeadamente quantificar os anticorpos dado que estes foram utilizados para fazer os estudos de aderência com os parasitas *in vitro*.

Para finalizar o trabalho foram feitos estudos *in vitro* com culturas de trofozoítos de *Giardia lamblia*. As lavagens intestinais e o soro recolhidos foram colocados em contacto com os parasitas e realizaram-se testes de aderência. O efeito que as lavagens intestinais e o soro podem ter na aderência é importante ser estudado uma vez que este parasita promove a sua infecção ligando-se às células epiteliais do intestino delgado.

Nos estudos de inibição de aderência realizados com as lavagens intestinais de animais imunizados e animais controlo, verificou-se que há mais trofozoítos aderidos quando em contacto com lavagens intestinais de animais controlo. As lavagens intestinais dos animais imunizados inibiram a aderência dos trofozoítos em aproximadamente 7 %. Este resultado pode indiar a potencial existência de anticorpos específicos anti- β -giardina, mesmo não tendo sido detetados IgG e IgA específicos nas lavagens intestinais. De facto, podem existir em baixas quantidades, não sendo detetados por ELISA, mas que consigam provocar a inibição na aderência.

Já em relação ao contacto do soro com os trofozoítos, os resultados de aderência não foram os esperados relativamente aos títulos de IgG específica anti- β -giardina detectados. O soro dos animais controlo e imunizados promoveram a aderência dos trofozoítos de *G. lamblia* praticamente de igual forma. Tudo indica que esta aderência do parasita tenha a ver com o facto do parasita necessitar de soro para crescer e aderir (o meio de cultura TYI-S-33 tem soro bovino inactivado) e assim quando os trofozoítos foram colocados na presença do soro dos murganhos ocorreu um efeito positivo na aderência do parasita. Contudo, não se pode afirmar que os anticorpos específicos IgG anti- β -giardina não inibam a aderência do parasita.

Este projeto poderia ainda ser melhorado e mais desenvolvido. As nanopartículas poderiam ainda se melhoradas quanto ao seu tamanho, como vimos é possível através da adição de Tween 80, mas alterar o método do micro BCA para quantificar a eficácia de encapsulamento do antigénio nas nanopartículas.

Ao nível do trabalho *in vivo* utilizar um número maior de animais para que seja possível verificar melhor a produção dos anticorpos e realizar o estudo só com imunizações orais, agora que já se tem um ponto de partida seria mais fácil. Para poder melhorar o trabalho também poderia incluir-se mais um grupo no estudo *in vivo*, um grupo que fosse apenas imunizado pela via subcutânea. Assim veria-se as diferenças na produção dos anticorpos nas duas vias de administração, quais os animais que teriam uma melhor resposta.

Seguimos um calendário de imunização que está descrito na secção de materiais e métodos, em que os animais foram imunizados de duas em duas semanas. Na literatura ,também está descrito que fazem administração oral 3 dias seguidos, depois fazem uma pausa e voltam a fazer o reforço, imunizando mais 3 dias seguidos .

Em relação à detecção dos anticorpos nas mucosas o método utilizado para a sua detecção teria se ser mais específica, utilizando por exemplo a técnica de imunofluorescência.

Para o trabalho ficar completo, o ideal seria infetar após as imunizações os animais em estudo com *Giardia* e ver se de facto a vacina produzida com nanopartículas de quitosano/ sulfato de sódio revestidas com alginato de sódio, carregadas com o antigénio β -giardina produz uma proteção eficiente contra a giardiase.

V. Bibliografia

-
- ADAM, R. D. (2001). **Biology of *Giardia lamblia***. Clinical Microbiology Reviews. 14(3): 447-475.
- ANKARKLEV, J. [et al.] (2010). **Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species**. Nature Reviews| Microbiology. 8: 413-422.
- AZIZI, A. [et al.] (2010). **Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells**. PloS Pathog. 6(11): e1001147.
- BORGES, O. [et al.] (2006). **Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination**. Journal of Controlled Release. 114: 348-358.
- BORGES, O. [et al.] (2008). **Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen**. International Immunopharmacology. 8: 1773-1780.
- BUSATTI, H. G.N.O., SANTOS, J. F. G., GOMES, M. A. (2009). **The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we?**. Biologics: Targets & Therapy. 3: 273–287.
- CORTHÉSY, B. (2013). **Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces**. Frontiers in Immunology. 185(4): 1-11.
- COSTA, S. [et al.] (2012). **The novel Fh8 and H fusion partners fo soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology**. Appl Microbiol Biotechnol. 97(15):6779-91.
- COSTA, S. [et al.] (2013). **A novel adjuvant-free H fusion system for the production of recombinant immunogens in *Escherichia coli*: its application to a 12 kDa antigen from *Cryptosporidium parvum***. Bioengineered 4(6):413-9.
- DE JONG, W. H., BORM, P. J. A. (2008). **Drug delivery and nanoparticles: Applicatins and hazards**. International Journal of Nanomedicine. 3(2): 133-149.
- DUTTA, P. K., DUTTA, J., TRIPATHI, V. S. (2004). **Chitin and chitosan**. Journal of Scientific & Industrial Research. 63: 20-31.
- ECKMANN, L. (2003). **Mucosal defences against *Giardia***. Parasite Immunology. 25: 259-270.
- ELMENDORF, H. G., DAWSON, S. C., MCCAFFERY, J. M. (2003). **The cytoskeleton of *Giardia lamblia***. International Journal for Parasitology. 33: 3-28.
- ELSABAHY, M., KAREN, L. W. (2012). **Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications**. Chem Soc Ver. 41(7): 2545-2561.
-

-
- ESCH, K. J., PETERSEN, C. A. (2013). **Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals**. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (1): 58-85.
- FELIZIANE, C. [et al.] (2011). **Immunodominant proteins α 1-giardin and β - giardin are expressed in both assemblages A and B of *Giardia lamblia***. *BMC Microbiology*. 11: 233.
- FISCHER, B. S., ESTRAÑO, C. E., COLE, J. A. (2013). **Modeling long-term host cell-*Giardia lamblia* interactions in an *in vitro* co-culture system**. *PLoS ONE*. 8(12): e81104.
- HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C. (2005). **Mucosal immunity and vaccines**. *Nature Medicine*. 11 (4): S45-S53.
- ISLAM, M. A. [et al.] (2012). **Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review**. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 6077-6093.
- JENIKOVA, G. [et al.] (2011). **α 1-giardin based live heterologous vaccine protects against *Giardia lamblia* infection in a murine model**. *Vaccine*. 29: 9529-9537.
- JÚLIO, C. (2012). **Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal**. *Parasites & Vectors*. 5: 22.
- LI, X. [et al.] (2011). **Relationship between the size of nanoparticles and their adjuvant activity: Data from a study with an improved experimental design**. *Eur J Biopharma*. 78(1): 107-116.
- LYCKE, N. Y., BEMARK, M. (2012). **The role of Peyer's patches in synchronizing gut IgA responses**. *Frontiers in Immunology*. 329(3): 1-9.
- MACARISIN, D. [et al.] (2012). **Immunolocalization of β - and δ -giardin within the ventral disk in trophozoites of *Giardia duodenalis* using multiplex laser scanning confocal microscopy**. *Parasitol Res*. 111: 241-248.
- OLSON, M. E., CERI, H., MORCK, D. W. (2000). ***Giardia* Vaccination**. *Parasitology Today*. 16(5): 213-217.
- OLSON, M. E. [et al.] (2001). **The use of a *Giardia* vaccine as an immunotherapeutic agent in dogs**. *Can Vet J*. 42: 865-868.
- PALM J. E. [et al.] (2003). **Identification of Immunoreactive Proteins during Acute Human Giardiasis**. *The Journal of Infectious Diseases*. 87:1849-59.

-
- PORPORRATO, C., BIANCO, I. D., CORREA, S. G. (2005). **Local and systemic activity of polisaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration.** Journal of Leukocyte Biology. 78(1): 62-69.
- PRUCCA, C. G. [et al.] (2008). **Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference.** Nature. 456: 750-754.
- RIVERO, F. D. [et al.] (2010). **Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine.** Nature Medicine. 16 (5): 551-558.
- Schematic representation of the lymphoid elements of the intestinal immune system.** [Acedido a 1 Julho de 2015] Disponível na internet: http://www.nature.com/nri/journal/v3/n4/fig_tab/nri1057_F1.html
- SYED, A. A., HILL, D. R. (2003). ***Giardia intestinalis*.** Current Opinion in Infectious Diseases. 16: 453-460.
- WATKINS, R. R., ECKMANN, L. (2014). **Treatment of Giardiasis: current status and future directions.** Curr Infect Dis Rep. 16: 396.
- World Health Organization (WHO) - **Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*).**, (2002). [Acedido a 25 de Junho de 2014]. Disponível na internet: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob5.pdf
- ZAMAN, M. [et al.] (2014). **Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation.** International Journal of Nanomedicine. 9: 899-912.

