

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALÉX JUNIOR DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE UM PEPTÍDEO IMUNOGÊNICO DA
PROTEÍNA APOLIPOPROTEÍNA N-ACETILTRANSFERASE DE *Brucella abortus*
COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE MACRÓFAGOS**

ALFENAS/MG

2024

ALÉX JUNIOR DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE UM PEPTÍDEO IMUNOGÊNICO DA
PROTEÍNA APOLIPOPROTEÍNA N-ACETILTRANSFERASE DE *Brucella abortus*
COM NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Andrade, Alex Junior de.

Avaliação da associação de um peptídeo imunogênico da proteína apolipoproteína n-acetiltransferase de *Brucella abortus* com nanopartículas de ouro sobre macrófagos : Efeito adjuvante de nanopartículas de ouro com peptídeo de *Brucella abortus* em macrófagos / Alex Junior de Andrade. - Alfenas, MG, 2024.

70 f. : il. -

Orientador(a): Leonardo Augusto de Almeida.

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

Bibliografia.

1. Brucelose. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Peptídeo. 4. Vacinas de subunidade. 5. Vacinologia reversa. I. Almeida, Leonardo Augusto de, orient. II. Título.

ALÉX JUNIOR DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE UM PEPTÍDEO IMUNOGÊNICO DA PROTEÍNA
APOLIPOPROTEÍNA N-ACETILTRANSFERASE DE *BRUCELLA ABORTUS* COM
NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE MACRÓFAGOS**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 2 de agosto de 2024.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida - Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Dr. Evandro Neves Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Augusto de Almeida, Professor do Magistério Superior**, em 02/08/2024, às 20:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,

§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_externo=0, informando o código verificador **1302793** e o código CRC **B2FE9CAD**.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Primeiramente, gostaria de agradecer às minhas três mães (minha mãe, minha avó e minha tia) pois, sem elas eu não estaria em lugar algum, agradeço por sempre me darem o alicerce necessário, me darem o exemplo e sempre confiarem e acreditarem em mim e me apoiarem em meus sonhos.

Ao professor Leonardo Augusto de Almeida pela orientação e profissionalismo. Agradeço pela paciência, compreensão, companheirismo e confiança, contribuindo para com o meu amadurecimento, enriquecimento e crescimento profissional e pessoal, despertando ainda mais o meu interesse pela pesquisa e alimentando minha paixão pela Imunologia e pelas vacinas. Obrigado por toda a dedicação, pelos ensinamentos e por me acolher como seu orientado, você é fera!

A minha namorada Ana Julia, que me atura, que acredita em mim em momentos que nem eu acredito, não me deixando desistir nunca e me apoiando como ninguém, te amo gata!

Aos meus amigos da república *Chaparrall* e de Jesuânia que são minha família e parte do gás que eu preciso todos os dias para continuar seguindo em frente, pois sozinho ninguém chega a lugar algum. Em especial ao Antônio que sempre me incentivou e me inspirou nos estudos.

Ao pessoal do nosso grupo de pesquisa do Labiomol, Thiago, Evandro e ao Léozão que me ajudaram muito nesse processo e em especial à Natalia por todo o suporte, paciência, aprendizagem e acolhimento que me deu, agradeço também a professora Patrícia Paiva Corsetti e as suas orientadas Ana, Yasmin e Giovana pelas trocas de conhecimento e amizade.

Agradeço ao meu amigo Hunter que foi um grande parceiro em vários momentos.

Ao professor Luciano Sindra Virtuoso do Laboratório de Química dos Colóides, pelos conhecimentos, aprendizados e dicas adquiridos, e seus orientandos, a Maria Luíza e em especial ao Thalles, por todo suporte e conhecimento compartilhado, além da parceria fundamental para que o trabalho pudesse ocorrer.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, aos professores - por todo o conhecimento transmitido nas aulas que me ajudaram a aprofundar e praticar os meus conhecimentos como biólogo. Agradeço especialmente à secretária Martha e ao coordenador Masaharu por toda a assistência prestada, e todos os técnicos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unifal: obrigado a todos vocês.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade e pelo meu crescimento acadêmico, profissional e como ser humano, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, de antemão, a disponibilidade de todos que compuseram minha banca de defesa da qualificação: Profa. Yara Luiza Coelho, Prof. Dr. Gilson Costa Macedo, Dr. Evandro Neves Silva, Prof. Tayllon dos Anjos Garcia, Profa. Andrezza Fernanda Santiago, e novamente, ao Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço também a CAPES e ao CNPQ, enfim, obrigado a todos.

RESUMO

As bactérias do gênero *Brucella*, um cocobacilo gram-negativo, são classificadas com base em seus hospedeiros primários, tendo a *Brucella abortus* como a mais distribuída globalmente e afetando principalmente a população de bovinos, causando aborto e infertilidade. Atualmente a forma de controle dessa doença é a vacinação dos animais, porém as vacinas que são comercializadas utilizam cepas atenuadas, e apesar de imunogênicas, apresentam várias desvantagens, como a prevalência de testes soropositivos em bovinos, ocorrendo incidência de virulência e contaminação acidental. Devido a isso, as vacinas de subunidades são abordagens promissoras, seguras, eficazes e com menor custo para produção. Nessa perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a conjugação do peptídeo imunogênico "AIPYILESTPQALAH" de *B. abortus* cepa 2308 com AuNPs e caracterizar essa associação sobre macrófagos. As AuNPs foram sintetizadas, seguidas de imobilização com o 11-ácido mercaptoundecanóico (MUA) e funcionalização com a reação química de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinamida (NHS). Cada etapa da síntese foi avaliada e os componentes caracterizados por FTIR, MEV-FEG, UV/VIS e DLS. Os dados indicam sucesso na associação com AuNPs@MUA e o peptídeo. A fim de entender a influência do bioconjugado, macrófagos derivados da medula óssea murina (BMDM) foram obtidos e tratados. Pelo teste de MTT foi observada uma diminuição de viabilidade celular em torno de 40%, nas amostras com AuNPs independente da bioconjugação, mostrando certo grau de toxicidade das AuNPs. Entretanto, as AuNPs foram capazes de promover um aumento de atividade metabólica dos macrófagos, havendo consumo de glicose e maior produção de lactato, houve também uma secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , seguido de produção de óxido nítrico, indicando que a nanopartícula já é capaz de gerar um efeito adjuvante, enquanto que o bioconjugado apresentou as mesmas respostas, mas de maneira menos elevadas, indicando uma boa biocompatibilidade. Os resultados indicam um promissor bioconjugado para ser avaliado em modelos pré-clínicos para futuramente uma maior abrangência do potencial terapêutico e imunológico deste candidato vacinal.

Palavras-chave: brucelose; nanopartículas de ouro; peptídeo; vacinas de subunidade; vacinologia reversa.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Brucella*, a gram-negative coccobacillus, are classified based on their primary hosts, with *Brucella Abortus* as the most distributed globally and mainly affecting the cattle population, causing abortion and infertility. Currently the form of control of this disease is the vaccination of the animals, but vaccines that are marketed use attenuated strains, and although immunogenic, have various disadvantages, such as the prevalence of seropositive tests in cattle, occurring incidence of virulence and accidental contamination. Because of this, subunit vaccines are promising, safe, effective and lower cost for production. From this perspective, the present work aims to evaluate the conjugation of *B. Abortus* strain 2308 immunogenic peptide "AIPYILESTPQALAH" with AuNPs and characterize this association on macrophages. AuNPs were synthesized, followed by immobilization with 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) and functionalization with the chemical reaction of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinamide (NHS). Each step of the synthesis was evaluated and the components characterized by FTIR, SEM-FEG, UV/VIS and DLS. The data indicate success in the association of AuNPs@MUA and the peptide. In order to understand the influence of the bioconjugate, murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained and treated. The MTT test showed a decrease in cell viability of approximately 40% in the samples with AuNPs regardless of the bioconjugation, showing a certain degree of toxicity of AuNPs. However, AuNPs were able to promote an increase in the metabolic activity of macrophages, with glucose consumption and increased lactate production. There was also secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , followed by nitric oxide production, indicating that the nanoparticle is already capable of generating an adjuvant effect, while the bioconjugate presented the same responses, but in a less elevated manner, indicating good biocompatibility. The results indicate a promising bioconjugate to be evaluated in preclinical models for a greater scope of the therapeutic and immunological potential of this vaccine candidate in the future.

Keywords: brucellosis; gold nanoparticles; peptide; subunit vaccines; reverse vaccinology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sir David Bruce	17
Figura 2 - Transmissão da brucelose	19
Figura 3 - Distribuição da brucelose no mundo	21
Figura 4 - Prevalência da Brucelose no Brasil em cada estado	21
Figura 5 - Perdas econômicas da brucelose bovina.....	23
Figura 6 - Posição do peptídeo, representada em modelagem molecular 3D	27
Figura 7 - Nanopartículas de ouro e suas aplicações.....	29
Figura 8 - Representação das respostas imunes inatas e adaptativas após exposição a vacinas baseadas em nanomateriais	31
Figura 9 - AuNPs sintetizadas pelo método de Turkevich	43
Figura 10 - UV-visível de AuNPs sintetizadas usando citrato de sódio como agente reductor	43
Figura 11 - Imagens de MEV-FEG das AuNP.....	44
Figura 12 - Interferograma de AuNPs-MUA	46
Figura 13 - Deslocamento batocrômico das AuNPs a cada etapa de modificação....	47
Figura 14 - Gráfico de barras representando as AuNP modificadas e conjugada na viabilidade das células BMDM.....	50
Figura 15 - Células BMDM produziram TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) quando estimuladas com AuNPs e o bioconjugado.....	51
Figura 16 - Células BMDM produzem NO quando estimuladas com AuNPs e o bioconjugado.....	52
Figura 17 - Dosagem de glicose e lactato produzido pelos BMDMS após os estímulos.....	53
Figura 18 - Representação da reação EDC/NHS.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - DLS das AuNPs e suas respectivas modificações.....	48
Tabela 2 - Potencial zeta das AuNP e suas respectivas modificações.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C -	Antes de Cristo
AMA -	<i>American Medical Association</i>
APCs -	Células apresentadoras de antígenos
AuNP -	Nanopartícula de ouro
AuNP@Cit -	Nanopartícula de ouro com citrato de sódio
AuNP@MUA -	Nanopartícula de ouro com 11-ácido mercaptoundecanóico
AuNP@Pep -	Nanopartícula de ouro com peptídeo
AVMA -	<i>American Veterinary Medical Association</i>
BMDM -	Macrófagos Derivados da Medula Óssea
Cit -	Citrato de sódio
DLS -	Espalhamento Dinâmico de Luz
EDC -	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FEG-SEM -	Canhão de emissão de elétrons por efeito de campo
FTIR -	Espectrometria vibracional no Infravermelho com transformada de Fourier
MEV-FEG -	Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução
LPS -	Lipopólissacarídeo
MUA -	11-ácido mercaptoundecanóico
MTT -	(brometo de (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazólio)
NHS -	N-hidroxisuccinamida
NO -	Óxido nítrico
NP -	Nanopartícula
Pep -	Peptídeo
PZ -	Potencial Zeta
VR -	Vacinologia Reversa
RPSL -	<i>Resonance Peak Scattering Length</i>
TLR4-	Receptor do tipo <i>Toll</i> 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	A DESCOBERTA DA FEBRE DE MALTA E O GÊNERO <i>Brucella</i>	16
2.2	A BRUCELOSE	18
2.3	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA E ECONÔMICA.....	19
2.4	VACINAS CONTRA A BRUCELOSE	24
2.4.1	Vacinas vivas atenuadas contra a brucelose animal	24
2.4.2	Vacinas de subunidades contra a brucelose.....	25
2.5	NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE E NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	27
2.6	PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ...	30
2.7	CONJUGAÇÃO DE PEPTÍDEOS NA SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	32
2.8	AUNPS COMO ADJUVANTE DE VACINAS BACTERIANAS	32
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	37
4.3	REAGENTES QUÍMICOS PARA TRATAMENTO COM AS AUNPS.....	37
4.4	AUNPS SINTETIZADAS PELO MÉTODO DE TURKEVICH.....	38
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO ...	38
4.6	MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AUNPS COM MUA.....	38
4.7	ESPECTROMETRIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	38
4.8	FUNCIONALIZAÇÃO VIA LIGAÇÃO COVALENTE	39
4.8.1	Espectroscopia UV-Vis.....	39
4.8.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	39
4.8.3	Potencial Zeta (PZ).....	40
4.9	MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMS).....	40
4.10	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT	41
4.11	DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA.....	41
4.12	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	42
4.13	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOSE E LACTATO	42
4.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42

5	RESULTADOS.....	43
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE AUNP	43
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO (MEV-FEG).....	44
5.3	ESPECTROMETRIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	45
5.4	ESPECTROMETRIA <i>UV-VIS</i>	46
5.5	DLS E POTENCIAL ZETA.....	48
5.6	AUNPS CONJUGADOS OU NÃO COM O PEPTÍDEO IMUNOGÊNICO PROVOCARAM DIMINUIÇÃO NA VIABILIDADE CELULAR EM BMDMS TRATADOS.....	49
5.7	O BIOCONJUGADO AUNP-PEPTÍDEO ESTIMULA UMA RESPOSTA PRÓ- INFLAMATÓRIA MAIS PROEMINENTE DO QUE O PEPTÍDEO ISOLADO...50	
5.8	AUNP@MUA E AUNP@CIT ESTIMULAM MAIOR PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) DO QUE O BIOCONJUGADO	54
5.9	METABOLISMO CELULAR.....	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A brucelose é uma zoonose negligenciada disseminada globalmente, sendo uma doença capaz de afetar qualquer órgão ou tecido com frequências variadas. As causadoras dessa doença são bactérias do gênero *Brucella*, microrganismos intracelulares, cocobacilos, gram-negativos, imóveis, que não esporulam e não encapsulam (Smith; Ficht, 2008). Esse gênero compreende várias espécies distintas que foram isoladas e identificadas, que podem infectar tanto animais domésticos como animais selvagens e são classificadas de acordo com a sua preferência de hospedeiro (Hull; Schumaker, 2018). Dentre elas, a *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* e *Brucella suis* são os principais causadores da brucelose em seres humanos (El-Sayed; Awad, 2018). Tendo a *B. melitensis* como a mais patogênica e a *B. abortus* como a mais disseminada globalmente, afetando aproximadamente 500 mil pessoas anualmente ao redor do mundo (Głowacka *et al.*, 2018). A *B. abortus* tem como hospedeiro preferencial os bovinos, e estima-se que aproximadamente 300 milhões dos 1,4 bilhão de bovinos no mundo estejam infectados por essa bactéria, apresentando também grandes prejuízos econômicos (Elfaki; Alaidan; Al-Hokail, 2015; O'Callaghan, 2020).

A principal forma de transmissão de *B. abortus* para os humanos ocorre através da ingestão de produtos lácteos contaminados que não passaram pelo processo de pasteurização (Lindahl-Rajala *et al.*, 2017). E, em menor grau, pela carne crua de animais infectados (Casalinuovo *et al.*, 2016). Nos animais, a contaminação se dá principalmente pelo contato direto com tecidos e secreções de animais infectados. Além disso, o comportamento natural dos bovinos de lambear e cheirar animais recém-nascidos ou fetos abortados também contribui para a propagação da infecção (Poester; Samartino; Santos, 2013).

Em seres humanos, a brucelose pode resultar em sintomas como febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas. Nos animais domésticos, a infecção tende a afetar principalmente os órgãos reprodutivos, levando ao aborto e à infertilidade (Hull; Schumaker, 2018). A brucelose em humanos geralmente não é fatal, mas é uma condição grave e debilitante que pode persistir por longos períodos, com tendência a se tornar crônica e duradoura (Hasanjani Roushan; Ebrahimpour, 2015; Byndloss; Tsolis, 2016).

Por ser um microrganismo intracelular, com uma preferência particular pelas células do sistema mononuclear fagocitário como macrófagos e células dendríticas, a resposta a *Brucella* spp. envolve todo o sistema imunológico, desde a imunidade inata até as respostas da imunidade adaptativa. Para combater eficazmente a infecção por *B. abortus*, é crucial uma resposta efetora dos linfócitos TCD4+ e TCD8+, bem como produzir citocinas e componentes típicos da resposta T auxiliar do perfil Th1 específicas contra bactérias intracelulares. Além disso, a ativação de macrófagos e células dendríticas também é essencial para combater a infecção (Masjedian Jezi *et al.*, 2019).

Considerando esses aspectos, para prevenir, controlar e erradicar a brucelose a estratégia mais eficaz envolve a vacinação de todos os animais hospedeiros suscetíveis (Briones *et al.*, 2001). As duas vacinas mais utilizadas e comercializadas para a imunização, são as cepas vivas atenuadas S19 e RB51, porém apresentam diversas desvantagens e complicações, podendo causar aborto e infertilidade. Ademais, a vacinação pode gerar anticorpos que interferem nos testes de diagnóstico sorológico da enfermidade (Lalsiamthara; Lee, 2017).

Além disso, essas vacinas são excretadas no leite, e a exposição acidental às vacinas vivas representam risco de infecção para seres humanos em contato direto, podendo também resultar em aborto e várias outras complicações (Franc *et al.*, 2018). Portanto, não há até então nenhuma vacina contra brucelose destinada a humanos.

Nesse contexto, diversos componentes de *Brucella*, incluindo peptídeos recombinantes, proteínas, DNA, LPS e proteínas da membrana externa (OMPs), estão sendo avaliados como potenciais vacinas de subunidades contra *B. abortus* (Lalsiamthara; Won; Lee, 2018).

Essas abordagens se mostraram altamente promissoras para pesquisa e desenvolvimento devido às suas características superiores em relação às vacinas vivas atenuadas convencionais, como uma segurança sem risco residual de virulência. No entanto, vacinas de subunidades enfrentam desafios significativos, onde problemas como eficácia protetora limitada e a necessidade de doses adicionais e adjuvantes estão entre eles (Lalsiamthara; Won; Lee, 2018)

Como ferramenta de busca para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade, a estratégia de vacinologia reversa (VR) é uma ferramenta de bioinformática inovadora e já mostrou ser eficaz na descoberta de antígenos

protetores contra outros patógenos significativos, como a vacina meningocócica B, demonstrando a eficácia desta abordagem no desenvolvimento de uma vacina contra essa bactéria (Pizza *et al.*, 2000).

Utilizando essa abordagem de vacinologia reversa, em nosso grupo de pesquisa, Oliveira *et al.*, 2021 identificaram um epítopo da proteína N-acetiltransferase, uma proteína de membrana da *B. abortus*, que foi explorado como um candidato vacinal e após os experimentos *in vivo* mostrou-se ser capaz de fornecer uma proteção robusta contra a doença além de menos dano tecidual nos animais, sendo um promissor candidato vacinal que pode ser explorado.

Uma forma de explorar a capacidade imunogênica desse peptídeo é a utilização de um adjuvante que seja capaz de aumentar seus índices de proteção. Neste contexto, a área de nanotecnologia vem sendo muito explorada no desenvolvimento de vacinas e na busca de um adjuvante que tenha uma baixa toxicidade e boa biocompatibilidade. Dentre os diversos nanomateriais, as Nanopartículas de ouro (AuNPs) têm despertado grande interesse em vacinologia, devido à sua funcionalização de superfície confiável, biocompatibilidade, personalização de tamanho, forma e propriedades ópticas, sendo capazes de aumentar amplamente as respostas imunes, além de garantir toxicidade mínima (Li; Wang; Ito, 2018). A utilização de AuNPs em vacinas proporciona dois benefícios fundamentais, elas funcionam como adjuvantes, potencializando a antigenicidade de antígenos conjugados, podendo replicar as características de agentes patogênicos, e também possuem capacidade de estimular tanto respostas imunes inatas quanto adaptativas (Reed; Orr; Fox, 2013; Yadav *et al.*, 2018).

Considerando a importância médico-sanitária e os prejuízos econômicos causados pela bactéria *B. abortus* causando uma zoonose significativa e negligenciada, impulsionados pela demanda por estratégias vacinais mais seguras e eficazes, temos como objetivo geral desse trabalho avaliar a conjugação do peptídeo imunogênico "AIPYILESTPQALAH" de *B. abortus* cepa 2308 com AuNPs e caracterizar essa associação sobre macrófagos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A DESCOBERTA DA FEBRE DE MALTA E O GÊNERO *Brucella*

Dentre as diversas doenças infecciosas que afetam a humanidade, a brucelose se destaca como uma significativa zoonose que está presente ao longo da história humana. A brucelose é uma doença muito antiga, e acredita-se que foi a quinta praga do Egito em 1600 a.C, onde acabou com os bovinos daquela região (Pappas *et al.*, 2006). Examinando os esqueletos de indivíduos que fugiram da erupção vulcânica de Pompéia, descobriu-se lesões características de brucelose em 17,4% dos adultos identificados (Capasso, 2002).

Em 1859, Martson identificou uma debilidade de natureza infecciosa distinta da febre tifoide, da qual ele mesmo estava sofrendo (Vassallo, 1992). Em alguns anos seguintes, essa enfermidade foi denominada “Febre do Mediterrâneo” e afetou numerosos marinheiros da Marinha Real Britânica estacionados na Ilha de Malta. O sintoma predominante era uma debilidade crônica intensa que podia evoluir para reumatismo, incapacitando diversos marinheiros em suas tarefas cotidianas (Wyatt, 1999).

A brucelose foi clinicamente registrada apenas no final do século XIX pelo Capitão David Bruce (figura 1), que extraiu a bactéria de baços de indivíduos que faleceram devido à recorrência da Febre de Malta (Nicoletti, 2002). A Febre de Malta era uma doença desafiadora de distinguir tanto sintomaticamente quanto clinicamente de outras febres comuns na região costeira do Mediterrâneo, onde causava significativa fraqueza física em alguns soldados ingleses moradores da ilha levando-os ao óbito. O agente causador dessa patologia, era uma bactéria, identificada por David Bruce como *Micrococcus melitensis*. Mais tarde, descobriu-se que essa bactéria era transmitida pelo consumo de leite de cabras locais (Nicoletti, 2002).

Esse alimento, considerado nutritivo, frequentemente era oferecido a pacientes hospitalizados como parte do tratamento para tifo, outra doença que era prevalente na Ilha de Malta. Em 1895, Bernhard Bang isolou um cocobacilo Gram-negativo de um caso de aborto bovino, nomeando-o “*Bacillus abortus*”. Posteriormente, observou-se uma notável semelhança entre o *Micrococcus melitensis* e o *Bacillus abortus*. Decidiu-

se então nomear esse novo gênero como *Brucella*, em honra ao seu descobridor, David Bruce (Meyer, 1976).

Figura 1 – Sir David Bruce. Descobridor do gênero *Brucella*.



Fonte: Nicoletti (2002)

Portanto, bactérias do gênero *Brucella*, são causadoras da zoonose chamada brucelose e são intracelulares, cocobacilos gram-negativos, imóveis, que não esporulam e não encapsulam (Smith; Ficht, 2008). Seu crescimento ocorre em condições aeróbias, embora certas espécies desse gênero exijam uma atmosfera enriquecida com 5 a 10% de CO₂. Elas crescem a 37°C em um meio nutritivo, com pH variando entre 6,6 e 7,4 e suas colônias se tornam evidentes em substrato sólido em um período de 2 a 3 dias (Alton *et al.*, 1988). A classificação filogenética se fundamenta no sequenciamento do gene codificador da subunidade ribossomal 16S das bactérias desse gênero (Moreno *et al.*, 1990). Essas bactérias foram posicionadas na classe α 2-proteobacteria, ordem Rhizobiales, família Brucellaceae e gênero *Brucella* (Meyer, 1976). Estabelecendo uma relação do gênero *Brucella* com outros gêneros de bactérias patogênicas que têm simbiose com plantas, como *Rhizobium meliloti* e *Agrobacterium tumefaciens*, bem como bactérias fotossintéticas como *Rhodobacter sphaeroides* e patógenos intracelulares obrigatórios, como a *Rickettsia* (UGALDE, 1999).

As espécies que são consideradas no gênero *Brucella* infectam tanto animais domésticos quanto animais selvagens (Hull; Schumaker, 2018). Essas espécies apresentam características antigênicas, metabólicas e preferência ao hospedeiro distintas, no qual foram classificadas de acordo com sua patogenicidade e

hospedeiros naturais como, por exemplo: *B. abortus* isolada de bovinos, *B. melitensis* isolada de ovinos e caprinos, *B. suis* isolada de suínos, *B. canis* isolada de cães, *B. ovis* isolada de carneiros e *B. neotomae* que foi isolada de ratazanas comuns e ratos do deserto norte americano (Whatmore, 2009; Blasco; Molina-Flores, 2011), *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis* destacam-se como as espécies mais relevantes tanto em animais quanto em seres humanos, seguindo uma ordem de gravidade crescente de infecção. Isso confere à brucelose o status de uma zoonose de relevância global (El-Sayed; Awad, 2018). Espécies que também infectam mamíferos marinhos, *B. pinnipedialis* que foram isoladas de morsas e focas e *B. ceti* isoladas de golfinhos, botos e baleias, mostrando como é ampla a escala ecológica e a importância deste gênero como uma zoonose (Cvetnić *et al.*, 2017). O genoma dessas bactérias é constituído por dois cromossomos circulares: o cromossomo I, com aproximadamente 2,1 Mb, e o cromossomo II, com cerca de 1,15 Mb. Com o sequenciamento completo da linhagem *B. abortus* 9-941, observou-se que a maior parte dos genes essenciais se encontra situada no cromossomo I (Halling *et al.*, 2005).

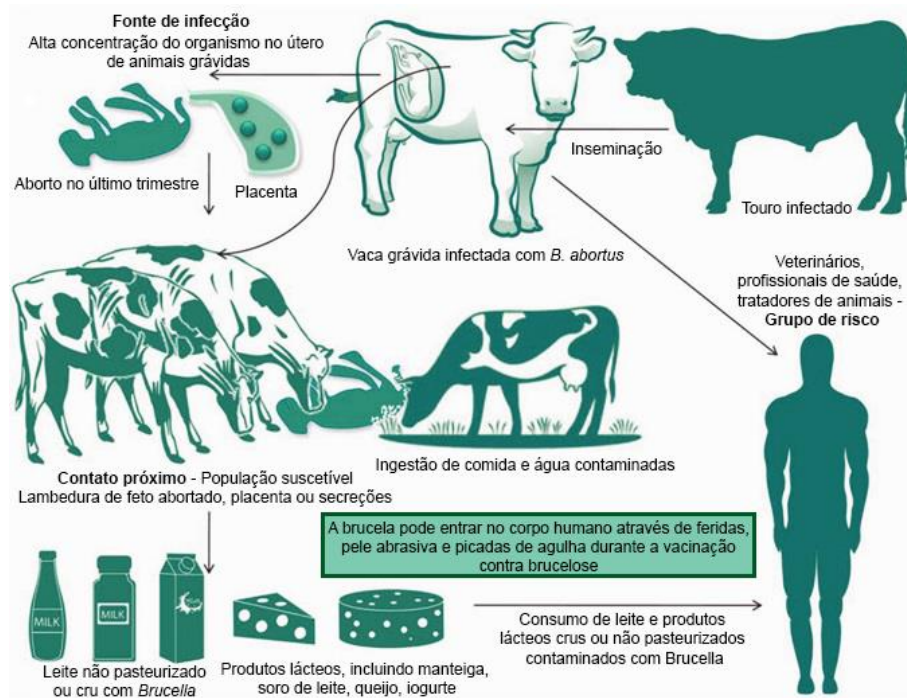
2.2 A BRUCELOSE

A brucelose é uma zoonose, contraída pelo contato com animais portadores da infecção ou pelo consumo de leite e seus derivados que estão contaminados, no qual traz grandes preocupações sanitárias (Nicoletti, 2002). O comportamento natural dos bovinos de lambear e cheirar animais recém-nascidos ou fetos abortados também contribui para a propagação da infecção (Poester; Samartino; Santos, 2013).

Em humanos, ocorre principalmente devido ao consumo de leite e seus derivados que estejam contaminados (Lindahl-Rajala *et al.*, 2017), sendo também associada ao consumo de carne contaminada (Casalinuovo *et al.*, 2016). Em seres humanos, a brucelose pode resultar em sintomas como febre ondulante, endocardite, artrite, osteomielite e complicações neurológicas. Nos animais domésticos, a infecção tende a afetar principalmente os órgãos reprodutivos, levando ao aborto e à infertilidade (Hull; Schumaker, 2018) (Figura 2).

A brucelose geralmente não é fatal em humanos, porém, é uma condição grave e debilitante que pode persistir por longos períodos, com tendência a se tornar crônica e duradoura (Hasanjani Roushan; Ebrahimpour, 2015; Byndloss; Tsolis, 2016).

Figura 2 – Transmissão da brucelose. As vacas grávidas geralmente abortam no último trimestre da gravidez.



Fonte: Adaptado de Khurana *et al.*, (2021).

Nota: O feto abortado, placenta e a secreção do útero atuam como fonte de infecção para outros animais. Leite e produtos lácteos podem atuar como fonte de infecção para o homem, se consumido não pasteurizado. Touros infectados servem como fonte vitalícia de infecção.

2.3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA, IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A *B. melitensis* é considerada a mais patogênica e a *B. abortus* a mais prevalente globalmente, afetando aproximadamente 500 mil pessoas anualmente ao redor do mundo (Głowacka *et al.*, 2018).

A *B. abortus* têm como hospedeiro preferencial os bovinos e mensura-se que 300 milhões das 1,4 bilhões cabeças de gado do mundo estejam infectadas. (Elfaki; Alaidan; Al-hokail, 2015; O'Callaghan, 2020) (Figura 3).

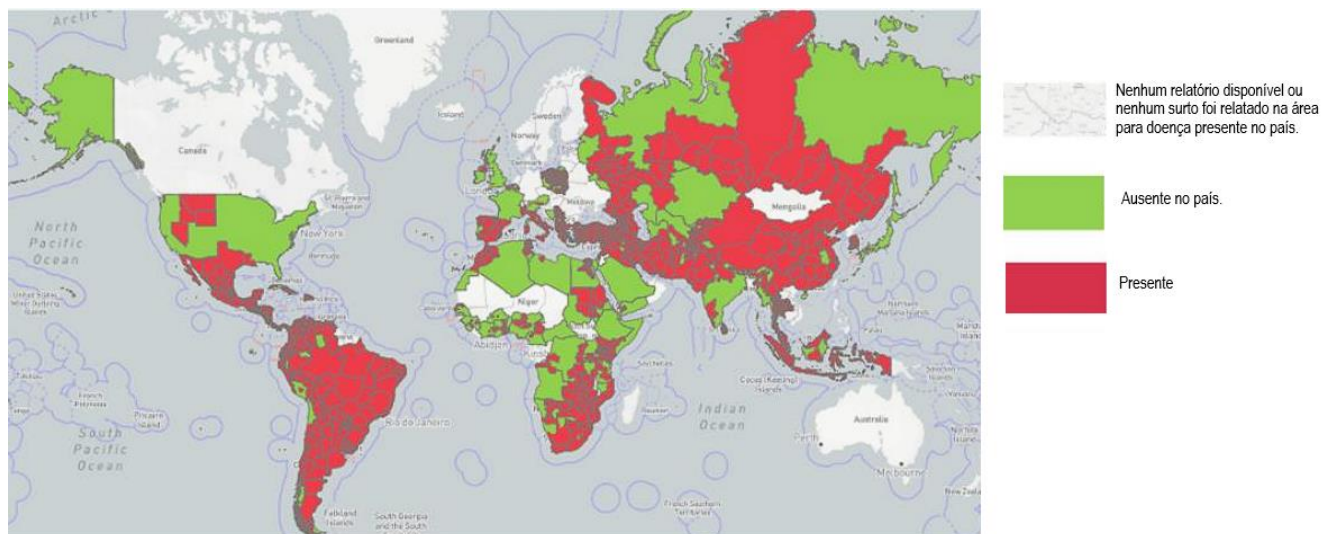
Em um estudo feito durante 19 anos (1996-2014) conduzido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), avaliou 156 países que foram categorizados em três

grupos distintos com base na situação da brucelose em animais. Essas categorias são definidas como: enzoótica para brucelose, os países que estão infectados por brucelose ou que se tornaram livres da doença por um período inferior a 3 anos; não enzoótico para brucelose, países onde a brucelose pode estar presente, porém, mantêm-se livres da doença por um período mínimo de 3 anos; e livres de brucelose, que corresponde a países que não registraram casos de brucelose ao longo do período do estudo de 19 anos (Cárdenas *et al.*, 2019; Khurana *et al.*, 2021).

Os países que classificados com status de controle da doença estão predominantemente localizados na Europa e na Oceania, além de Canadá e Estados Unidos. Em contrapartida, nações com alta prevalência ou status enzoótico de brucelose são encontradas principalmente na América Central e do Sul, e em diversas regiões da África e em partes da Ásia (Cárdenas *et al.*, 2019; Khurana *et al.*, 2021). A brucelose é endêmica na Ásia Ocidental, Índia, Oriente Médio, Sul da Europa e América do Sul (Shinde, 2007; Franc *et al.*, 2018; Mantur; Amarnath) (Figura 3). No Irã, um estudo relatou que *B. abortus* é a mais prevalente (Dadar *et al.*, 2019). Relatos de baixa incidência de brucelose em áreas endêmicas poderiam ocorrer devido a uma monitorização inadequada ou à subnotificação (Mcdermott; Arimi, 2002). A *B. abortus* é o principal agente causador da doença em partes da África, América do Sul e do Sul da Europa (Fosgate *et al.*, 2002; Megid *et al.*, 2005; Wareth *et al.*, 2014). Na Itália, tanto o gado como os búfalos são afetados por *B. abortus* principalmente nas áreas do sul (Garofolo *et al.*, 2017).

A epidemiologia desta doença permanece dinâmica e imprevisível, pois novas cepas podem emergir e as cepas existentes podem se adaptar a diferentes espécies animais, além de se ajustarem a novos cenários e mudanças. A doença é rara em crianças, mas em áreas endêmicas tais casos foram já notificados (Caksen *et al.*, 2002; Mantur *et al.*, 2004).

Figura 3 – Distribuição da brucelose no mundo.

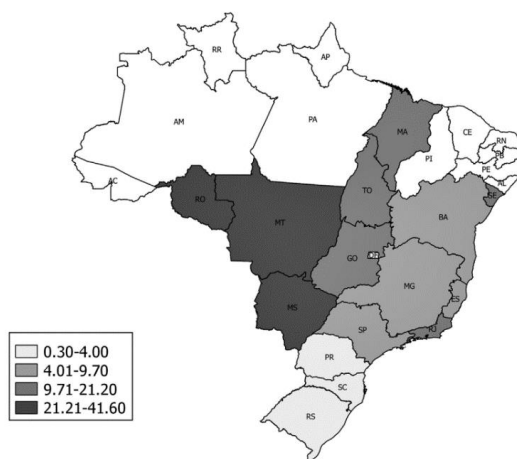


Fonte: adaptado de Khurana (2021).

Nota: Alta prevalência ou status enzoótico de brucelose ocorre principalmente na América Central e do Sul, e em diversas regiões da África e em partes da Ásia

No contexto brasileiro, a brucelose bovina é causada por *B. abortus*, onde também é considerada endêmica, apresentando prevalências de rebanhos positivos que variam de 0,32% a 41,60% nas populações de gado bovino dentre os diferentes Estados (Alves *et al.*, 2015; De Alencar Mota *et al.*, 2016) (Figura 4).

Figura 4 – Prevalência da brucelose no Brasil em cada estado. A prevalência de brucelose em rebanhos positivos varia de 0,32% a 41,60% nas populações de gado entre os diferentes Estados.



Fonte: De Alencar Mota *et al.* (2016)

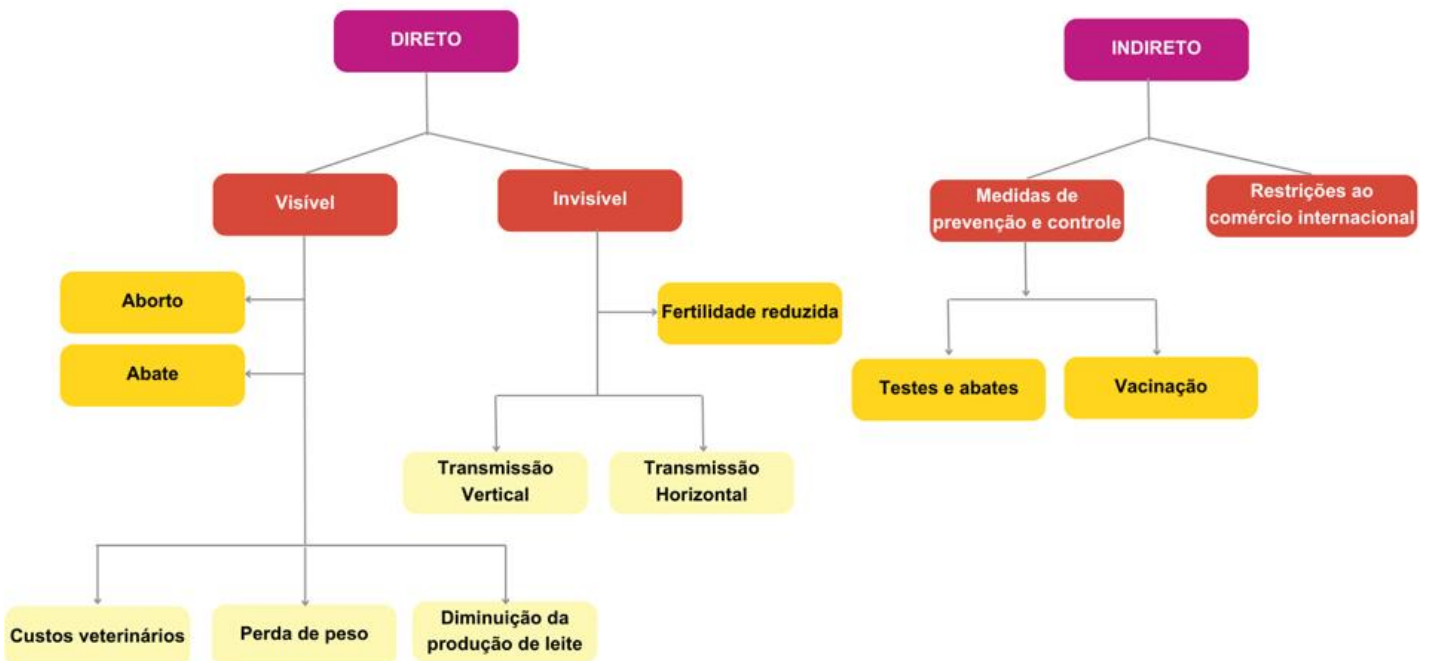
Uma predominância maior de fêmeas no rebanho aumenta a susceptibilidade à doença, e também ocorre risco de contrair a infecção pela aquisição de animais de reposição provenientes de fazendas de gado não certificadas. (De Alencar Mota *et al.*, 2016).

A relevância zoonótica da brucelose como uma zoonose ganha destaque devido ao significativo crescimento no comércio mundial de produtos de origem animal, ao acelerado desflorestamento, ao desenvolvimento não planejado e insustentável, à urbanização, à expansão da agricultura intensiva e à criação de animais em regime migratório/nômade (Memish; Balkhy, 2004).

Mesmo com medidas rigorosas e sofisticadas de vigilância e controle, a incidência de brucelose não diminuiu significativamente na maioria dos países em desenvolvimento, isso ocorre devido à ausência de condições sanitárias adequadas, carência de infraestrutura de saneamento, situações de pobreza, gestão inadequada e ausência de comprometimento político para enfrentar o problema (Pappas *et al.*, 2006).

A brucelose tem impactos significativos no bem-estar e na economia pecuária. As perdas econômicas são resultantes da diminuição na produção de leite, ocorrência de abortos, morte de bezerros recém-nascidos decorrentes dos abortos, abate de animais afetados pela doença, restrições à exportação e comércio de animais, além dos custos relacionados à ausência de trabalhadores, despesas com cuidados veterinários e médicos, e investimentos administrativos e governamentais em programas de pesquisa e controle da doença (Khurana *et al.*, 2021) (Figura 5).

Figura 5 – Perdas econômicas da brucelose bovina. Efeitos e prejuízos econômicos direto e indireto causados pela brucelose.



Fonte: Adaptado de Dawood *et al.*, (2023).

A brucelose bovina resulta em perdas econômicas nos países da América Latina no valor de aproximadamente US\$ 600 milhões (Khurana *et al.*, 2021). O custo do programa nacional de controle e erradicação da brucelose nos EUA foi da ordem de 3,5 mil milhões de dólares durante o ano de 1934 a 1997 e o custo devido à redução na produção de leite e aos abortos só em 1952 foi estimado em 400 milhões de dólares (Sriranganathan *et al.*, 2009).

Causando sérios prejuízos para a saúde pública e para o bem-estar econômico, é indispensável o combate à brucelose, e devido a sua relevância zoonótica, a brucelose é conferida na abordagem denominada *One Health*, termo originado dos esforços conjuntos da *American Veterinary Medical Association* (AVMA) e da *American Medical Association* (AMA), essa abordagem se caracteriza pela sua concepção de integração entre saúde humana, animal, de plantas e ecossistemas, incentivando a relação multidisciplinar nos esforços locais, nacionais e globais, afim de chegar a ótimos níveis de saúde e cooperação entre disciplinas distintas com o intuito de abordar as complexas adversidades enfrentados na saúde (Ghanbari *et al.*, 2020).

2.4 VACINAS CONTRA A BRUCELOSE

A estratégia mais eficaz para prevenir, controlar e erradicar a brucelose envolve a vacinação de todos os animais hospedeiros suscetíveis em áreas de risco e a remoção dos animais que testam positivo em regiões endêmicas da doença (Briones *et al.*, 2001). Embora as vacinas contra *Brucella* sejam empregadas como uma estratégia de controle, elas não garantem uma proteção 100% bem-sucedida contra a doença (Olsen; Stoffregen, 2005).

Estudos indicam que a exposição média à *Brucella* oferece proteção a aproximadamente 65% dos animais que foram vacinados (Aznar *et al.*, 2017). Os critérios para uma vacinação eficaz contra a *Brucella* permanecem consistentes desde sua definição há muitos anos, no qual a vacina ideal deve ser segura e eficiente e não induzir a produção de anticorpos que interfiram nos testes sorológicos. Além disso, ela não deve ser transmissível a seres humanos ou outros animais, garantindo a ausência de contaminação em leite, órgãos comestíveis, produtos lácteos ou carne (Franc *et al.*, 2018). A vacina deve ser estável tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ter a capacidade de ser produzida em larga escala e possuir marcadores que a distingam dos isolados naturais da doença (Blasco *et al.*, 2023).

2.4.1 Vacinas vivas atenuadas contra a brucelose animal

As cepas *Brucella* S19, RB51 e Rev1 são empregadas como vacinas vivas atenuadas (Masjedian Jezi *et al.*, 2019; Blasco *et al.*, 2023).

A atenuação natural dos genes catabólicos do eritritol na *B. abortus* S19 levou à perda de uma região de 720 pb em relação à cepa original, resultando em uma cepa com menor virulência (Gheibi *et al.*, 2018). A vacinação com essa cepa atenuada promove um elevado nível de imunidade, proporcionando proteção aos animais contra a infecção por um extenso período, que pode perdurar ao longo de toda a vida produtiva do animal (Schurig; Sriranganathan; Corbel, 2002).

Porém, a vacina S19 apresenta diversas desvantagens, podendo interferir nos testes sorológicos para diagnóstico da brucelose, causar abortos em certos animais vacinados e prenhes, diminuir a produção de leite e ser patogênica para os seres humanos (Lalsiamthara; Won; Lee, 2018; Gupta *et al.*, 2019).

Além disso, alguns animais podem desenvolver níveis persistentes de anticorpos, levando a abortos e excreção da cepa da vacina no leite (Franc *et al.*, 2018).

A cepa RB51 de *B. abortus* é caracterizada como um mutante resistente à rifampicina, é uma cepa que foi derivada de uma única colônia rugosa obtida a partir da cepa virulenta e lisa de *B. abortus* 2308. Através de subculturas consecutivas dessa cepa, houve a deleção do gene *wboA*. Este gene é responsável pela codificação de uma glicosiltransferase crucial para a produção da cadeia lateral O, essa vacina não afeta os resultados sorológicos (Blasco; Moreno; Moriyón, 2021).

Porém a cepa RB51 é capaz de infectar seres humanos, e uma de suas principais limitações é a resistência ao antibiótico rifampicina, frequentemente utilizado no tratamento da brucelose em humanos (Lalsiamthara; Lee, 2017; Gupta *et al.*, 2019). A vacina *B. melitensis* Rev1 poderia ser adequada para proteger ovinos e caprinos contra a brucelose (Dorneles *et al.*, 2014). Contudo, possui um impacto adverso, uma vez que pode induzir abortos em animais gestantes após a imunização e também pode ser secretada no leite (Godfroid; Nielsen; Saegerman, 2010).

Dentre elas, atualmente, as mais utilizadas e comercializadas para a imunização de bovinos são as cepas vivas atenuadas S19 e RB51 (Lalsiamthara; Lee, 2017; Gupta *et al.*, 2019).

2.4.2 Vacinas de subunidades contra a brucelose

Diversos componentes de *Brucella*, incluindo peptídeos recombinantes, proteínas, DNA, LPS e proteínas da membrana externa (OMPs), estão atualmente sendo avaliados como potenciais vacinas de subunidades contra *B. abortus* (Lalsiamthara; Won; Lee, 2018).

Essas abordagens se mostraram altamente promissoras para pesquisa e desenvolvimento devido às suas características superiores em relação às vacinas vivas atenuadas convencionais, como uma segurança elevada sem risco residual de virulência e a possibilidade de aplicação em humanos e animais gestantes. No entanto, apesar de representarem alternativas atraentes às vacinas vivas atenuadas tradicionais, as vacinas de subunidades enfrentam desafios significativos, onde problemas como eficácia protetora limitada e a necessidade de doses adicionais e

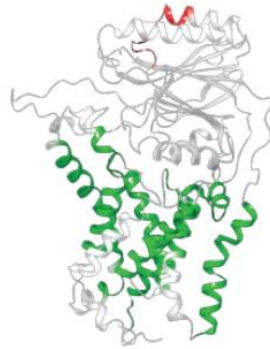
adjuvantes estão entre eles. Assim, uma melhoria nas vacinas de subunidades pode ser alcançada ao utilizar antígenos potentes para células T, induzindo uma resposta imunológica do tipo Th1, que se destaca na proteção contra a brucelose (Hop *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2016; Lalsiamthara; Won; Lee, 2018).

Proteínas como OMP16, OMP19, a proteína de lipossomos L7/L12, OMP25, p39 (uma possível proteína de ligação periplasmática) e AsnC são proteínas que estão sendo exploradas como vacinas de subunidades contra *Brucella*, apresentando uma resposta do perfil Th1 comparável com as vacinas S19 (Gupta *et al.*, 2019; Tadepalli *et al.*, 2016). Outras vacinas de subunidades de *Brucella*, como a diidrolipoamida succiniltransferase (rE2o) e a cisteína sintase A (rCysK), têm a capacidade de estimular uma resposta imunológica do tipo Th2, porém com um grau de proteção relativamente inferior (Verma; Jain; Kumar, 2012; Jain; Afley; Kumar, 2013). Ademais, quando comparadas à vacina S19, as proteínas citosólicas SurA e DnaK geram níveis de proteção mais reduzidos em um modelo murino (Delpino *et al.*, 2007). Além disso, as proteínas BP26 e BLS também se destacam como principais candidatas para o diagnóstico sorológico da brucelose (Tian *et al.*, 2020).

De maneira interessante, a utilização da proteína recombinante OMP25c em conjunto com o adjuvante de Freund induziu respostas imunológicas do tipo Th1 e Th2 em camundongos, alcançando níveis de proteção comparáveis aos proporcionados pela vacina S19 (Paul *et al.*, 2018). Outro estudo mais notável é com uma combinação de diversas proteínas recombinantes de *B. abortus*, como AspC, Dps, Ndk e InpB, como vacinas de subunidade, onde gerou elevados níveis de título de IgG2a e demonstrou eficácia protetora equivalente à cepa da vacina RB51 (Hop *et al.*, 2018).

Com a premissa das vacinas de subunidades, nosso grupo de pesquisa identificou um epítipo da proteína N-acetiltransferase (Figura 6), uma proteína de membrana da *B. abortus* cepa 2308, onde foi explorado como um candidato vacinal.

Figura 6 – Posição do peptídeo, representada em modelagem molecular 3D.



Fonte: Oliveira *et al.* (2021).

Nota: A proteína é representada em branco; o epítipo selecionado é destacado em vermelho e as hélices transmembranares são indicadas nos modelos em verde.

Os resultados revelaram uma diminuição no número de bactérias viáveis no fígado, baço e linfonodo axilar em camundongos vacinados em comparação com aqueles não vacinados. Observou-se um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e IL-6, juntamente com aumento na expressão de genes anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β no fígado, corroborando com uma diminuição no tamanho e quantidade de granulomas. Além disso, em BMDMs estimulados com o sobrenadante dos esplenócitos de camundongos vacinados e infectados, exibiram marcação para CD86+ mais intensa que os outros estímulos.

Ademais, ocorreu maior presença de iNOS, levando a um aumento na produção de óxido nítrico (NO). Tais descobertas sugerem um aprimoramento na capacidade dessas células de fagocitar e eliminar a bactéria, indicando um potencial candidato vacinal (Oliveira *et al.*, 2021).

2.5 NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE E NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia refere-se à ciência voltada para a criação e manipulação de matéria em dimensões extremamente reduzidas, variando de 1 a 100 nm. Nos últimos anos, observou-se um rápido avanço das aplicações da nanotecnologia na área de vacinas, dando origem ao campo denominado "nanovaciniologia", esta tecnologia proporciona possibilidades inovadoras para o desenvolvimento de materiais,

especialmente na área médica, superando as limitações das abordagens tradicionais (Kheirollahpour *et al.*, 2020).

Ao desenvolver nanopartículas, a nanotecnologia não só otimiza a entrega de antígenos, direcionando APCs e servindo como um reservatório para o antígeno, como também desempenha uma função crucial no estímulo inicial da resposta imunológica, funcionando como um adjuvante (Mamo; Poland, 2012; Sulczewski *et al.*, 2018; Yadav *et al.*, 2018).

As características e dimensões das nanoestruturas determinam suas funções e aplicações na nanotecnologia. Existem três categorias fundamentais de nanomateriais, classificados em: nanofibras (unidimensionais), os nanotubos (bidimensionais) e as nanopartículas (tridimensionais) (Rabkin *et al.*, 2015).

Dentre as diversas nanopartículas disponíveis, encontramos variedades como lipídios, proteínas auto-organizáveis, biopolímeros e substâncias inorgânicas (Polito, 2020). As nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas são consideradas um dos nanomateriais mais promissores para o avanço no desenvolvimento de uma próxima geração de vacinas (Cao-Milán; Liz-MARzán, 2014; Compostella *et al.*, 2017; Mateu Ferrando; Lay; Polito, 2020).

Em 1986, AuNPs foram empregadas pela primeira vez como carreador de haptenos, facilitando a preparação de anticorpos (Shiosaka *et al.*, 1986).

Desde então, muitos estudos tem sido publicados, onde se nota que as propriedades adjuvantes estão intrinsecamente associadas às próprias AuNPs (Dykman; Khlebtsov, 2011).

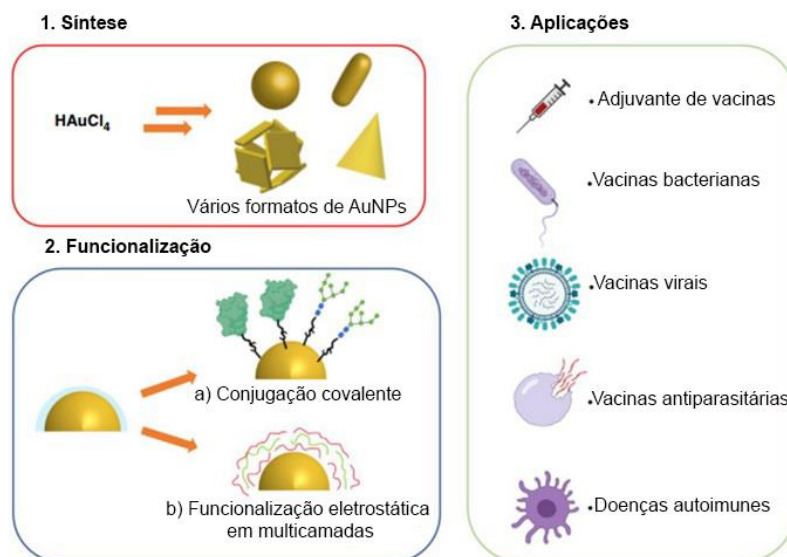
AuNPs têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento de vacinas, superando outros nanomateriais em utilização, sua composição específica da é fundamental para determinar sua eficácia no transporte, nas propriedades farmacocinéticas, na taxa de liberação e nas interações com as células, incluindo a biodegradação e a biocompatibilidade, dimensões entre 10 e 20 nm são facilmente capturadas por macrófagos e células dendríticas, o que potencializa sua eficácia ao melhorar o reconhecimento e a apresentação do antígeno (Dykman, 2020; Mateu Ferrando; Lay; Polito, 2020; Oyewumi; Kumar; Cui, 2010).

O interesse nesses nanomateriais em vacinologia, se dá devido à sua funcionalização de superfície bem estabelecidos, boa biocompatibilidade, personalização de tamanho, forma e propriedades ópticas, sendo capazes de

aumentar amplamente as respostas imunes, além de garantir uma baixa toxicidade (Dykman, 2020; Li; Wang; Ito, 2018).

As AuNPs são geralmente sintetizadas por uma reação redutiva do ácido cloroáurico (HAuCl_4), usando procedimentos bem estabelecidos de Turkevich ou Brust-Schiffins seguidos de modificação e estabilização da superfície (Turkevich; Stevenson; Hillier, 1951). Dependendo do tamanho e morfologia desejados, o sal precursor Au^3 é reduzido a Au^0 por meio de citrato de sódio, ou borohidreto de sódio ou ácido ascórbico com a eventual presença de um agente modelador. Com a capacidade de funcionalização relativamente direta utilizando agentes de revestimento como o 11-ácido mercaptoundecanóico (MUA), confere grande versatilidade às AuNPs, estendendo seu uso no campo da saúde (Compostella *et al.*, 2017; Mateu Ferrando; Lay; Polito, 2020) (Figura 7).

Figura 7 – Nanopartículas de ouro e suas aplicações. 1: Síntese das AuNPs. 2: Funcionalização das AuNPs com ligantes, proteínas, peptídeos e oligo ou polissacarídeos, a) funcionalização covalente, b) funcionalização por múltiplas camadas. 3: Aplicações usando AuNPs.



Fonte: Mateu Ferrando; Lay; Polito (2020).

2.6 PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

No ano de 1996, foi evidenciada a viabilidade da utilização de AuNPs como carreadores de um antígeno proteico do capsídeo do vírus da encefalite transmitida por carrapatos, explorado como uma vacina antiviral onde apresentou melhores propriedades protetoras em comparação com vacinas equivalentes comerciais (Demenev *et al.*, 1996).

As AuNPs têm demonstrado capacidade de estimular a atividade fagocítica dos macrófagos e influenciar o funcionamento dos linfócitos (Staroverov *et al.*, 2009).

AuNPs conjugadas com antígenos demonstraram afetar a ativação das células T, demonstrando um aumento de dez vezes na proliferação dessas células em comparação com a utilização de um antígeno nativo, esses achados sustentam a possibilidade da ação das células T, promovendo assim, com a ação de citocinas como IFN- γ , a ativação de macrófagos e eliminação do patógeno (Dykman; Khlebtsov, 2011).

A penetração de AuNP conjugada com peptídeo no citoplasma de macrófagos, resulta em sua ativação, onde após a interação dos conjugados com PRRs como TLR-4 dos macrófagos, é possível a penetração na célula, seguido de secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, interleucina-1 β e interleucina-6 por esses macrófagos, bem como a indução de óxido nítrico sintase e interrupção da proliferação desses macrófagos (Bastús *et al.*, 2009).

Estudos indicam que as AuNP também conseguem penetrar nas células através de outro mecanismo não inflamatório, que é por interações com receptores *scavengers* (Dobrovolskaia; Mcneil, 2007).

Ao se administrar AuNPs na célula, pode ocorrer a adsorção de várias proteínas plasmáticas na superfície das AuNPs formando um revestimento chamado de coroa proteica, no qual os principais componentes são apolipoproteínas, imunoglobulinas e componentes do complemento, assim, esse processo de opsonização facilita no reconhecimento de AuNPs pelas células fagocíticas (Patra *et al.*, 2016)

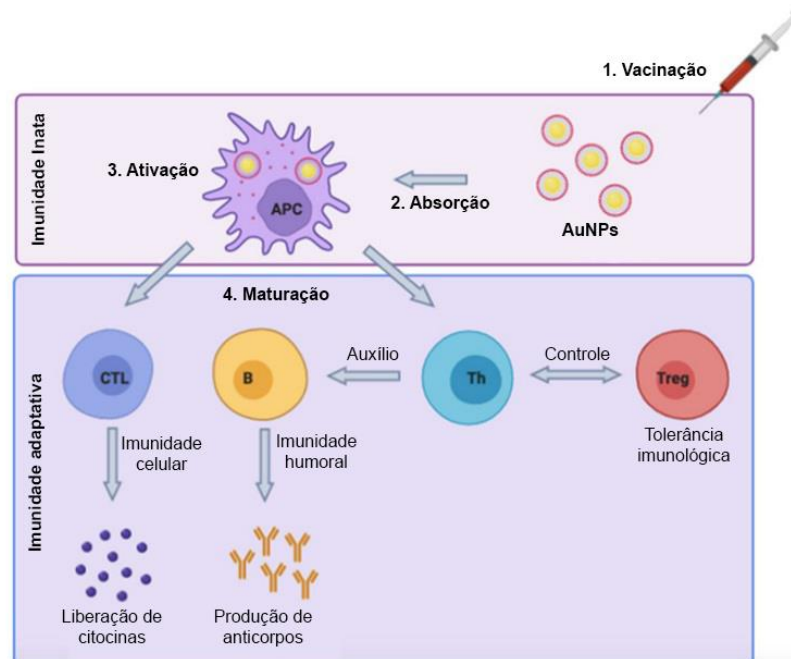
Ademais, temos estudos onde demonstraram que as AuNPs apresentam capacidade de prolongamento da meia-vida de vacinas (Bimler *et al.*, 2019).

Neste contexto, acreditamos que as AuNPs possuem condições favoráveis para o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas, principalmente pelo seu potencial uso como adjuvante.

Portanto, pode-se considerar que a utilização de AuNPs em vacinas proporciona dois benefícios fundamentais, elas podem funcionar como adjuvantes, potencializando a antigenicidade de antígenos conjugados ou adsorvidos e podem também agir como um antígeno por si só, sendo capaz de replicar as características de agentes patogênicos, podendo estimular respostas imunes inatas e consequentemente as adaptativas (Reed; Orr; Fox, 2013; Yadav *et al.*, 2018) (Figura 8).

Estas características das nanopartículas permitem um direcionamento celular e liberação de antígenos eficientes (Demento *et al.*, 2012).

Figura 8 – Representação das respostas imunes inatas e adaptativas após exposição a vacinas baseadas em nanomateriais.



Fonte: Mateu Ferrando; Lay; Polito (2020).

Nota: As APCs processam os antígenos e promovem a proliferação de células T em direção a respostas celulares, humorais ou tolerogênicas

2.7 CONJUGAÇÃO DE PEPTÍDEOS NA SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Ao associar os peptídeos às AuNPs, se produz uma interface nanotecnológica com uma massa facilmente capturada por fagócitos e capaz de estimular a resposta imune, podendo provocar uma produção de anticorpos contra esses peptídeos. Um fator que afeta diretamente a capacidade imunogênica recém-adquirida pelos peptídeos é o método de imobilização usado. Normalmente, as principais técnicas utilizadas são baseadas em: adsorção, através de atração eletrostática, interações hidrofóbicas e de van der Waals; ou por acoplamento covalente, aproveitando a afinidade entre os grupos funcionais das moléculas (Mu *et al.*, 2014).

A superfície de AuNPs pode ser funcionalizada formando ligações estáveis com compostos contendo enxofre (MUA) ou por revestimento multicamada (Sun; Zhang; Jin, 2012).

Ao se estabelecer a imobilização da AuNP com o MUA, um dos métodos mais comuns para conjugar biomoléculas envolve o uso dos agentes EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-Hidroxisuccinamida) (Sanz *et al.*, 2022).

O EDC é um agente de ligação cruzada que acopla radicais carboxílicos a aminas primárias. O EDC é essencial para essa reação, contudo, com a adição do NHS ou Sulfo-NHS a eficácia dessa ligação aumenta, possibilitando um sistema mais estabilizado capaz de ser armazenado para uso posterior. Além disso, ao contrário do que acontece com outros reagentes que acabam participando da ligação entre as biomoléculas, no caso do EDC e do NHS isso não ocorre, sem contar que essa reação pode ocorrer à temperatura ambiente (Brandt *et al.*, 1970).

2.8 AUNPS COMO ADJUVANTE DE VACINAS BACTERIANAS

As AuNPs têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento de anticorpos e vacinas contra infecções bacterianas (Dykman, 2020; Mateu Ferrando; Lay; Polito, 2020).

Assim, a literatura oferece vários exemplos, como: nanopartículas de 15 nm foram empregadas como adjuvantes para produzir anticorpos contra antígenos da superfície da *Yersinia pseudotuberculosis* (Staroverov *et al.*, 2003). Foi avaliado a

eficácia de AuNPs de 15 nm revestidas com o antígeno F1 de *Yersinia pestis* na imunização de animais, onde administraram um conjugado de AuNP@F1 em camundongos e os resultados apresentaram uma resposta elevada de anticorpos IgG contra o antígeno F1, em comparação com aqueles que receberam o antígeno F1 isolado em solução salina tamponada com fosfato ou no composto Alhydrogel®. Os soros desenvolvidos contra o antígeno F1 ligado às nanopartículas mostraram capacidade de se conectar ao antígeno F1 em um ensaio imunoenzimático (Kireev *et al.*, 2008).

Em outro estudo AuNPs decoradas com glicosídeos tiolados, que são análogos sintéticos dos polissacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis*, foram utilizadas como antígenos artificiais para imunização (Manea *et al.*, 2008). Em outro estudo, os conjugados de AuNP de 15 nm, combinados com antígenos de superfície de *Salmonella typhimurium*, promoveram a atividade respiratória dos macrófagos e a funcionalidade das enzimas mitocondriais, especificamente succinato desidrogenase e glicerofosfato desidrogenase, tal estímulo pode desempenhar um papel crucial nas características adjuvantes das AuNPs (Sengupta *et al.*, 2022).

Foi desenvolvida uma abordagem inovadora para criar anticorpos contra a tuberculina aproveitando as capacidades adjuvantes das AuNPs, onde anticorpos policlonais contra a tuberculina foram gerados pela injeção repetida de 7,5 µg de tuberculina ligada a AuNP de 15 nm em coelhos. Estes anticorpos mostraram altos níveis de titulação, enquanto que, nos coelhos do grupo controle, que receberam apenas tuberculina, não se detectou a presença de anticorpos no soro (Staroverov; Dykman, 2013).

Burkholderia pseudomallei é uma bactéria gram-negativa encontrada em regiões tropicais e subtropicais, responsável pela doença conhecida como melioidose em seres humanos e outros mamíferos. Utilizando a ferramenta de vacinologia reversa, foram identificadas novas proteínas imunogênicas associadas à *B. pseudomallei*, hemaglutinina e a FlgL, respectivamente. Estas proteínas foram integradas em uma vacina nanoglicoconjugada, utilizando AuNPs de 15 nm previamente revestidas com lipopolissacarídeos (LPS) altamente imunogênicos da cápsula bacteriana, como resultado o bioconjugado com AuNPs gerou uma maior resposta de anticorpos e menor carga bacteriana nos baços dos animais tratados (Gregory *et al.*, 2015).

Descobertas recentes e promissoras utilizando glico-AuNPs de 15 nm conjugadas com proteínas imunogênicas mostraram maior produção de anticorpos IgG específicos para o antígeno e altos níveis de LPS em camundongos, adicionalmente, os testes de imunização revelaram uma taxa de sobrevivência entre 90% e 100% após serem desafiados com uma exposição letal à bactéria *B. pseudomallei* (Muruato *et al.*, 2017).

Também utilizando a abordagem de vacinologia reversa, identificaram duas proteínas imunogênicas de *Escherichia coli*, LomW e EscC e essas proteínas foram covalentemente ligadas à superfície de AuNPs de 15 nm para combater a *Escherichia coli* enterohemorrágica, um patógeno humano globalmente reconhecido por causar diarreia e colite hemorrágica. Utilizando um ligante tiol para conectar as proteínas às AuNPs, esses compostos foram administrados subcutaneamente em ratos, resultando em respostas imunológicas robustas caracterizadas por altos títulos de IgG e IgA para ambos os antígenos (Sanchez-Villamil; Tapia; Torres, 2019).

As AuNPs mostraram ser uma opção promissora como adjuvante para uma nova vacina contra a listeriose, uma doença causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, que pode resultar em infecções graves em pessoas com sistema imunológico enfraquecido, bem como afetar fetos e recém-nascidos. As AuNPs foram modificadas com dois peptídeos associados à virulência da *L. monocytogenes*: listeriolisina O (LLO) 91-99 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) 1-22. Estudos abrangentes demonstraram a eficácia dessas AuNPs funcionalizadas com peptídeos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, promovendo uma resposta imunológica robusta com ativação de células T CD8+. Além disso, quando combinadas com o adjuvante AdvaxTM, adjuvante à base de carboidratos derivado de micropartículas de delta bD-[2-1]poli(fruto-furanosil)aD-glicose (delta inulina), essa resposta imunológica foi potencializada (Calderón-Gonzalez *et al.*, 2016; Rodriguez-Del Rio *et al.*, 2015).

As GAPDH associadas a AuNPs mostraram uma capacidade de cruzar a barreira placentária, resultando na proteção de recém-nascidos que foram infectados através da transmissão vertical da bactéria estudada. Notavelmente, os recém-nascidos cujas mães foram vacinadas, observou-se um aumento significativo nos níveis de IL-12, ao passo que os níveis de IL-6 foram reduzidos (Calderón-Gonzalez *et al.*, 2016).

Contra *Pseudomonas aeruginosa* as AuNPs também mostraram, quando conjugadas com os domínios N-terminais da flagelina dessa bactéria (conhecidos como flagelina (1-161)), altos níveis de anticorpos IgG específicos contra a flagelina, estes anticorpos foram capazes de reconhecer e neutralizar a bactéria em modelos experimentais com camundongos (Dakterzada *et al.*, 2016).

Em um estudo recente, as AuNPs foram exploradas pela primeira vez como um agente inibitório contra moléculas de sinal bacteriano no qual foi demonstrado um grande potencial como abordagem terapêutica para superar a resistência bacteriana contra antibióticos convencionais, como a gentamicina (Ghaffarlou *et al.*, 2022).

Já em outro estudo, AuNPs funcionalizadas com peptídeo de *Gluconacetobacter liquefaciens* demonstrou resultados de baixa citotoxicidade e melhorou significativamente a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos (Liu, Y *et al.*, 2020).

Assim sendo, neste contexto com todos esses exemplos apontados, podemos apurar que a abordagem de AuNPs como adjuvante se mostra muito promissora e permite diversas possibilidades no desenvolvimento de um candidato vacinal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a conjugação do peptídeo imunogênico "AIPYILESTPQALAH" de *B. abortus* com AuNPs e caracterizar a influência dessa associação em macrófagos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar, imobilizar e caracterizar as AuNPs estruturalmente;
- b) Associar covalentemente a AuNP com o peptídeo da apolipoproteína N-acetiltransferase de *B. abortus* cepa 2308 e caracterizar estruturalmente a superfície dessa bioconjugação;
- c) Avaliar a influência e a biocompatibilidade das AuNP e do bioconjugado em macrófagos derivados da medula óssea murina (BMDM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi conduzido em estrita conformidade com as leis brasileiras 6.638 e 9.605 em Experimentação Animal. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (CEUA 16/2020).

4.2 PEPTÍDEO "AIPYILESTPQALAH" SELECIONADO POR VACINOLOGIA REVERSA

Conforme descrito anteriormente, em nosso grupo de pesquisa, a partir da ferramenta de vacinologia reversa, OLIVEIRA *et al.*, 2021, identificaram o peptídeo da proteína de membrana N-acetiltransferase, de *Brucella abortus* cepa 2308, contendo 15 aminoácidos, AIPYILESTPQALAH, respectivamente, sendo explorado como um possível candidato vacinal.

O peptídeo foi sintetizado pela empresa Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento e se encontra disponível para pesquisa em nosso Laboratório de Biologia Molecular dos Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas-MG.

4.3 REAGENTES QUÍMICOS PARA TRATAMENTO COM AS AUNPS

Foram utilizados o ácido tetracloroáurico e citrato trissódico para a síntese das AuNPs. Para a funcionalização das AuNP@citrato, utilizou-se ácido 11-mercaptoundecanóico. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), e o N-hidroxisuccinamida (NHS), foram usados para o acoplamento covalente dos peptídeos. As vidrarias foram lavadas com água corrente e detergente, e higienizadas com água régia (HCl 3:1 HNO₃) preparada a fresco, seguida de nova lavagem com água destilada, e finalmente ambientalizadas com água ultrapura e secadas em estufa a 37°C, todos os reagentes foram adquiridos do Laboratório de Química dos Coloides da Universidade Federal de Alfenas-MG.

4.4 AUNPS SINTETIZADAS PELO MÉTODO DE TURKEVICH

O método de redução do ouro é bem conhecido e empregado (Turkevich; Stevenson; Hillier, 1951). Aqui, utilizando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante, a síntese das AuNPs foi realizada utilizando 0,2860 mL de ácido tetracloaurico (HAuCl_4) em 100 mL de água ultrapura. A solução de concentração $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L foi levada a aquecimento onde permaneceu até que fosse alcançado a temperatura de 98 °C, em seguida foi adicionado 5 mL de citrato trisódico 1% m/m. Após 9 minutos de reação, a dispersão foi retirada do aquecimento e colocada em repouso a temperatura ambiente.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) foi empregada para avaliação da forma e distribuição de tamanho das AuNPs. As imagens das AuNPs foram obtidas com microscópio Philips XL-30 FEG com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a 10 a 25 keV, spot 4 e distância 5 mm.

4.6 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS AUNPS COM MUA

Uma quantidade de 1 mL de uma solução etanólica de 10 mM de MUA foi imediatamente adicionada à 10 mL de AuNP, sob agitação a 450 rpm, por um período de 100 horas, a uma temperatura de 25 °C. Após esse intervalo, o material foi então armazenado em geladeira (2 – 8 °C).

4.7 ESPECTROMETRIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Para monitorar as ligações formadas durante a etapa de modificação da superfície com o MUA, foram realizadas medidas de FTIR, que é uma técnica avaliada

para identificação de mudanças de ligantes em ligantes específicos (Mudunkotuwa; Minshid; Grassian, 2014).

Para isso, foi utilizado uma gota da amostra muito concentrada, em um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific Nicolet, modelo IS 50 FT-IR, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe), com uma transmitância de 95%.

4.8 FUNCIONALIZAÇÃO VIA LIGAÇÃO COVALENTE

O grupo carboxílico (COOH) das moléculas de MUA ligadas à AuNP foram ativados segundo o protocolo EDC/NHS (Sanz *et al.*, 2022).

Foram preparadas soluções de EDC 0,667 mM e NHS 1,33 mM e adicionado simultaneamente 50 μ L de ambas as soluções na dispersão AuNP@MUA em uma razão molar de 2,57 e 5,12 para EDC/MUA e NHS/MUA respectivamente, em seguida a mistura reagiu por 1 hora e foi adicionado o peptídeo (5 μ g) que ficou *overnight* fazendo a reação de conjugação.

4.8.1 Espectroscopia UV-Vis

O espectrofotômetro Evolution TM300 (Thermo), foi utilizado para esta finalidade. Os espectros foram observados posicionando duas cubetas de quartzo com capacidade volumétrica de 4 mL no espectrofotômetro. Todos os coloides de AuNP@Cit e AuNP@MUA, juntamente com o bioconjugado, foram analisados à temperatura ambiente (25 °C), e a varredura da absorbância foi realizada no intervalo de 350 à 750 nm, com uma resolução de 2 nm.

4.8.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS, para medir o espalhamento de luz dinâmico para medir o tamanho hidrodinâmico das AuNPs sintetizadas, modificadas com MUA e bioconjugadas, considerando a distribuição de tamanho da partícula em termos de intensidade, área, volume e quantidade, foram adicionadas alíquotas de 1 mL do coloide em uma célula descartável de capilar dobrável DTS1070.

4.8.3 Potencial Zeta (PZ)

Para análise da carga superficial das AuNPs, foi utilizado novamente o Zetasizer Nano ZS, onde uma alíquota de 1 mL do coloide foi colocada em uma célula descartável de capilar dobrável DTS1070 com par de eletrodos de ouro para medir a mobilidade eletroforética das partículas coloidais à temperatura ambiente (25 °C).

4.9 MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA (BMDMS)

Camundongos C57BL/6 foram eutanasiados com dose letal de cetamina 0,4 mg/g (anestésico) e xilazina 0,2 mg/g (relaxante/anestésico) seguido de deslocamento cervical para extração de seus fêmures e tíbias. As epífises destes ossos foram cortadas, seguidos da injeção de cloreto de sódio 0,9% estéril por osso até a remoção completa da medula óssea. A suspensão de células foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos e o precipitado de células ressuspendido em 1 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de hepes. As amostras foram filtradas em separadores de nylon com a malha de 70 µm para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Após a filtração, as células foram plaqueadas em Placas de Petri e incubadas a 37°C por 2 horas, em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e posteriormente ressuspendidas em 1 mL de DMEM suplementado. As células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer através da marcação de azul de Tripán e plaqueadas na concentração de 3x10⁵ células por poço, em uma placa de 24 poços, suplementadas com meio DMEM e 10% de LCCM (*L929 cell conditioned medium*) como uma fonte de fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF).

Por fim, a placa foi incubada a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ com adição de 100 µL de LCCM por poço no quarto dia após o plaqueamento das células e no sétimo dia o meio foi trocado por um novo DMEM suplementado e 10% de LCCM.

As células BMDM cultivadas (3x10⁵ células/poço), foram estimuladas com 100µL de cada estímulo em triplicata contendo concentrações específicas (LPS 1µg/mL, Peptídeo 1µg/mL, AuNP@cit (NANO CIT) 1µg/mL, AuNP@MUA (NANO

MUA) 1µg/mL e AuNP@MUA-Pep (NANO + PEP) 1µg/mL). Como controle negativo as células foram mantidas em solução de cultura celular (DMEM).

4.10 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

O ensaio de MTT (brometo de (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilterazólio) permite avaliar a viabilidade celular, analisando a atividade metabólica das células a nível mitocondrial (Van Meerloo; Kaspers; Cloos, 2011).

As BMDM cultivadas (3×10^5 células/poço) que foram estimuladas, e 24 horas após, receberam adição de solução de MTT em cada poço e foram lavadas com solução salina 0,9%. As placas foram então mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por 3 horas, e os cristais formados foram dissolvidos em 700µl de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. A absorbância foi avaliada em leitor de placas espectrofotômetro a 550nm.

4.11 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Os níveis secretados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram avaliados a partir do sobrenadante das células BMDMs que receberam os estímulos: Meio (CT), Peptídeo (PEP), AuNP@MUA (NANO MUA), AuNP@Citrato (NANO CIT), AuNP@MUA-Peptídeo (NANO + PEP) e LPS. Utilizando 100 µL desses sobrenadantes, os níveis de TNF- α foram avaliados com o Kit de Desenvolvimento Murino TNF- α Padrão ABTS ELISA, os níveis de IL-1 β com o Kit de Desenvolvimento Murino IL-1 β Padrão ABTS ELISA, e os níveis de IL-6 com o Kit de Desenvolvimento Murino IL-6 Padrão ABTS ELISA, ambos seguindo as instruções do mesmo fabricante (PeproTech Inc). As concentrações finais de citocinas foram calculadas utilizando curvas padrão para cada citocina avaliada (TNF- α , IL-1 β e IL-6). A reação final foi medida em um leitor de microplacas (Bio-Tek *Instruments*, Winooski, VT, EUA) a 405nm. Todas as medições foram realizadas em triplicata e as diferenças nos níveis secretados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste t ($p \leq 0,05$).

4.12 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A dosagem da concentração de NO foi feita a partir do método colorimétrico de Greiss. Resumidamente, 100 µL dos sobrenadantes das culturas de células que receberam os estímulos foram colocados em triplicata em uma placa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado igual volume do reagente de Greiss. Um reagente cuja solução é composta de 50mL de sulfanilamida de 1% e 50mL de dihidroclorato de naftil-1-n-etilenodiamina 0.1, no qual estes dois reagentes são preparados com ácido fosfórico a 2,5% (Greiss *et al.*, 1982). A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA), em 490nm e os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste t ($p \leq 0,05$).

4.13 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOSE E LACTATO

Para determinar os níveis de glicose e lactato presentes no sobrenadante das células estimuladas, 100 µL de cada sobrenadante foi utilizado para avaliar a concentração de glicose pelo método enzimático colorimétrico de ponto final e a concentração de lactato pelo sistema enzimático, conforme o kit comercial (Labtest®). As absorbâncias de ambos foram medidas em um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA), a 505nm para glicose e 550nm para lactato. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as concentrações de glicose e lactato foram analisadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste t ($p \leq 0,05$), utilizando o programa PRISMA.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para se analisar os resultados do MTT, ELISA, NO, glicose e lactato, os valores obtidos foram comparados quanto suas médias, na avaliação de duas médias ou por ANOVA unidirecional seguido pelo teste t ($p \leq 0,05$), através do programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) e também o programa Excel. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE AUNP

Neste estudo, as AuNPs foram sintetizadas utilizando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante e como resultado as nanopartículas apresentaram uma coloração vermelho-rubi (Figura 9).

Figura 9 – AuNPs sintetizadas pelo método de Turkevich.

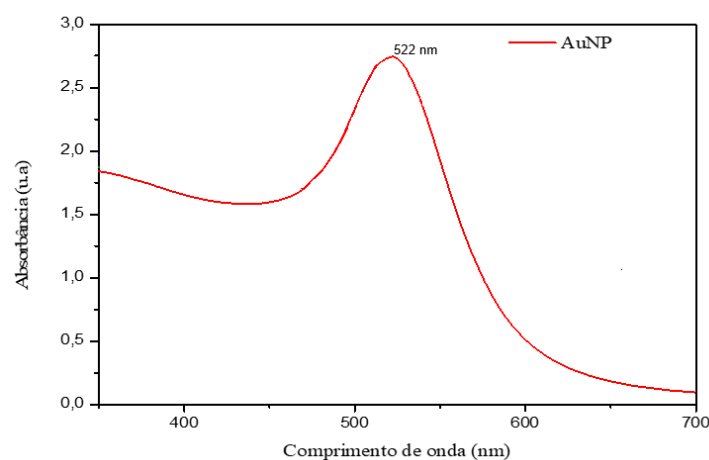


Fonte: Autor (2024).

Nota: A coloração vermelho-rubi é característica de AuNP de 15nm.

A amostra foi analisada por espectrofotometria UV-vis onde o tamanho, o formato e a dispersão das AuNPs num sistema coloidal, podem ser indicados pelo comprimento de onda da absorbância máxima (λ máx), que no caso apresentou um valor de 522nm, condizentes com AuNPs de 15nm (Figura 10).

Figura 10 – Espectroscopia de absorção no UV-visível de AuNPs sintetizadas usando citrato de sódio como agente redutor.



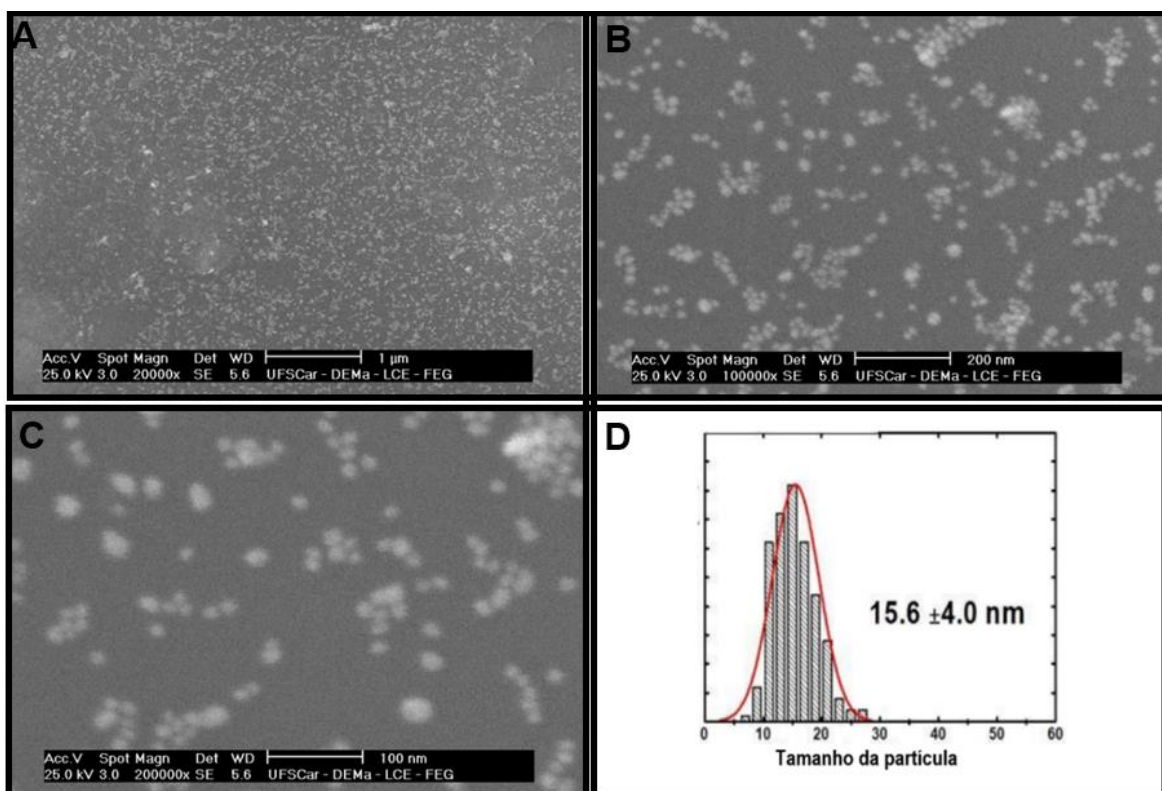
Fonte: Autor (2024).

Nota: Pico de absorbância máxima (λ máx) indica AuNP de 15 nm.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE ALTA RESOLUÇÃO (MEV-FEG)

Sendo o tamanho e a forma das nanopartículas duas das características que definem a aplicação do material em diferentes sistemas, foi realizada a micrografia a fim determinar esses parâmetros. A figura 12, apresenta as imagens de MEV-FEG de AuNP sintetizadas em um momento anterior à sua modificação de superfície, onde a partir da Figura 11-A, é possível observar partículas uniformes ao longo da dispersão. Embora alguns pontos levam à interpretação de partículas com tamanho muito elevado, não é possível afirmar, visto que, a imagem nesse ponto não possui uma aproximação suficiente para tal. As Figuras 11-B e 11-C, mostram as partículas sintetizadas com formato esférico e uniforme, além disso, a medida de tamanho, de forma aleatória de aproximadamente 200 partículas, infere sobre o tamanho real do sistema com partículas de aproximadamente 15 nm conforme a Figura 12-D.

Figura 11 – Imagens de MEV-FEG das AuNP. Aproximações de 1 μ m, 200 nm e 100 nm, respectivamente.



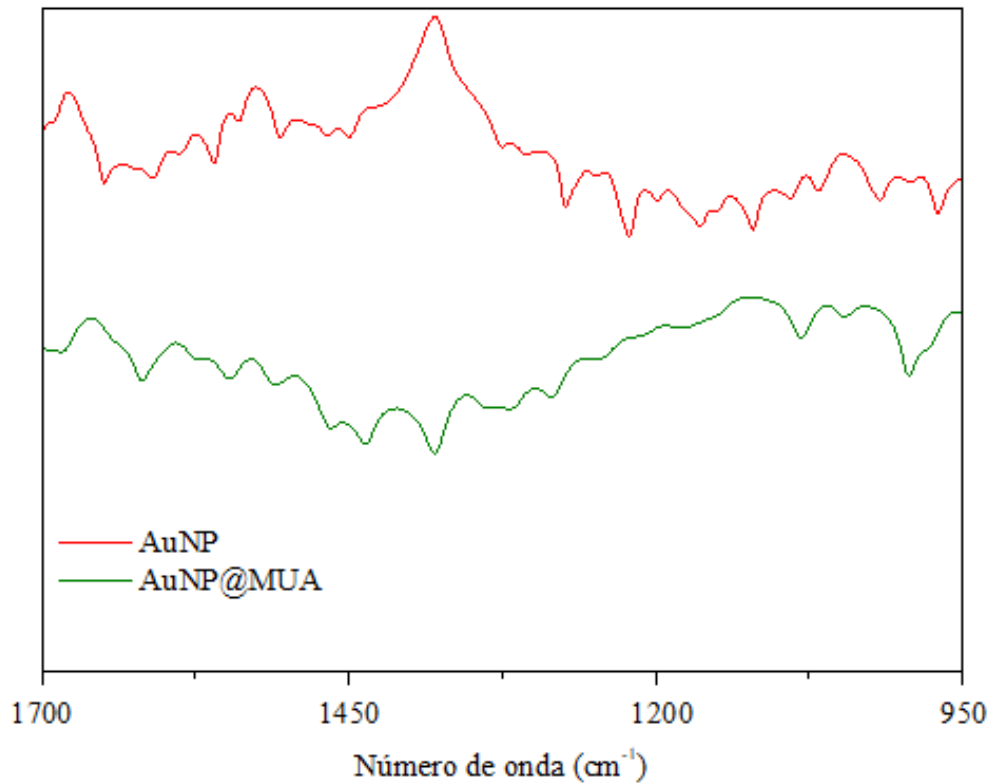
Fonte: Autor (2024).

5.3 ESPECTROMETRIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A técnica de análise FTIR foi empregada para examinar a alteração superficial das AuNPs, este é um método comumente utilizado para avaliar processos de troca de ligantes em ligantes específicos (Mudunkotuwa; Minshid; Grassian, 2014).

Essa modificação de superfície utilizando MUA, além de proporcionar uma maior estabilidade das AuNPs devido ao seu maior tamanho em relação ao citrato, proporciona uma superfície ativa para incorporação de diferentes estruturas químicas devido ao seu grupo carboxílico (COOH). Para observar a mudança do agente estabilizador de superfície uma amostra de AuNP@cit e AuNP@MUA, foram analisadas por FTIR conforme apresentado na Figura 12. É possível observar os estiramentos antissimétricos e simétricos relacionados ao grupo COO- do MUA na região de 1650 a 1500 cm^{-1} e 1400 a 1350 cm^{-1} respectivamente. Em seguida, observa-se os espectros de AuNP@cit e AuNP@MUA com deslocamentos para menores comprimentos de onda dos estiramentos simétricos e antissimétricos. Esse comportamento é esperado uma vez que as ligações na AuNP diminuem o estiramento vibracional devido ao deslocamento da densidade eletrônica das moléculas. Contudo, como nas AuNP@cit também existem grupos carboxílicos expostos, essa análise não pode ser usada como única evidência para a ocorrência da incorporação do MUA, mas juntamente com a observação do aumento da estabilidade da dispersão e os deslocamentos observados no espectro UV-Vis é indicativo do sucesso da funcionalização.

Figura 12 – Interferograma de AuNPs@MUA.



Fonte: Autor (2024).

Nota: Bandas características de COO- antissimétrico (1650 a 1500 cm^{-1}) e COO simétrico (1400 a 1350 cm^{-1}).

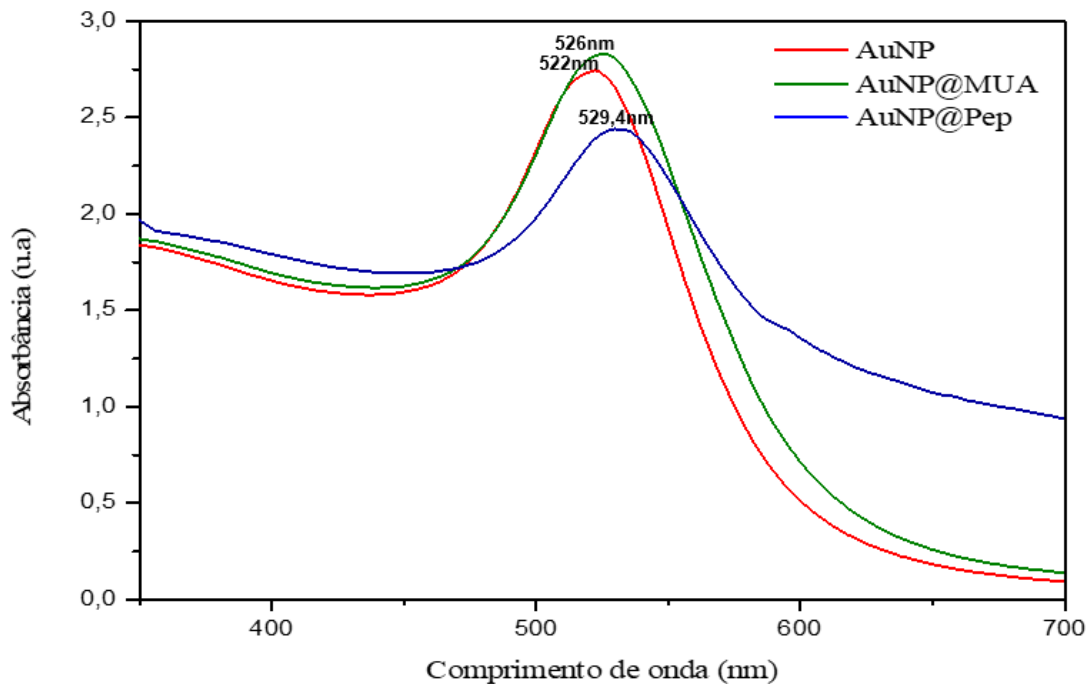
A região de estiramento simétrico e antissimétrico caracterizam a presença do MUA na superfície (Ansar; Chakraborty; Kitchens, 2018). As bandas seguintes são referentes aos ruídos do equipamento, seguidos dos estiramentos e vibrações de CH.

5.4 ESPECTROMETRIA UV-VIS

Com as análises de espectroscopia na região do visível é possível estimar a concentração das AuNPs, como apresentado na Figura 13. Além disso, infere de forma indireta o tamanho das partículas, sendo observado pela análise do pico da banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR), onde valores de 521 e 522 nm, são correlacionados com AuNPs de tamanho médio próximo a 15 nm. Entretanto, quando ocorre uma modificação na superfície das AuNPs os elétrons presentes na superfície que são provenientes dos grupos funcionais interfere nos elétrons da banda

de valência (BV) das AuNPs levando a uma diminuição da sua energia, representado por um deslocamento para maiores comprimento de onda ou red shift, quando isso ocorre, partículas com tamanho médio de 15 nm podem apresentar pico SPR em comprimento de onda maior que 522 nm.

Figura 13 – Deslocamento batocrômico das AuNPs a cada etapa de modificação.



Fonte: Autor (2024).

Nota: A análise do espectro revela que a introdução do MUA desloca o λ máximo de 522 nm para 526 nm, e no conjugado com o peptídeo o deslocamento foi de 526 nm para 529,4 nm.

Analisando a Figura 14, é possível observar a formação de AuNP@cit com pico SPR próximo a 522 nm evidenciando assim a formação de partículas com tamanho médio de aproximadamente 15 nm. Após a modificação de superfície das AuNP@cit utilizando MUA, há um deslocamento batocrômico (maiores comprimentos de onda) sutil, que pode estar relacionado com uma maior estabilidade das AuNPs nesse caso. Quando ocorre a conjugação do peptídeo em AuNP@MUA, o mesmo deslocamento é observado, podendo ser analisado de forma semelhante. Além disso, é observado uma absorbância significativamente menor das AuNP@MUA-Pep em comparação com as AuNP@Cite AuNP@MUA, isso se deve principalmente a perda nos processos de centrifugação e retirada do sobrenadante.

5.5 DLS E POTENCIAL ZETA

As análises de potencial zeta e DLS ajudam na investigação das propriedades das diferentes NPs onde, é possível observar nos dados de DLS na Tabela 1, um aumento no raio hidrodinâmico das AuNPs à medida que diferentes estruturas são imobilizadas na superfície. O tamanho dessas estruturas altera o raio hidrodinâmico à medida que as camadas dielétricas vão se afastando do centro metálico, além disso, para as AuNP/Pep, os valores elevados de diâmetro podem estar relacionados com a atração das macromoléculas de proteína, levando a uma espécie de aglomerado de AuNP que conseqüentemente espalha de forma não uniforme, aumentando assim o tamanho calculado pelo equipamento. Ainda deve ser levado em consideração os ajustes no modelo matemático utilizado no software do equipamento, bem como, suas limitações em baixas concentrações e tamanho de partículas.

Tabela 1 – DLS das AuNPs e suas respectivas modificações.

Amostra	DLS 1	DLS 2	DLS 3
AuNP@cit	18,6 nm	18,4 nm	19,1 nm
AuNP@MUA	21,0 nm	21,7 nm	21,3 nm
AuNP@MUA-Pep	1230 nm	1506 nm	1745 nm

Fonte: Autor (2024).

O potencial zeta das AuNP e AuNP/MUA se encontram em valores esperados literatura em torno de -42,0 mV e -45,0 mV respectivamente. Esses valores são atribuídos aos grupos COO⁻ presentes nas extremidades dos agentes estabilizantes citrato e MUA em condições de pH próximo a neutralidade. Já para as AuNP/Pep, os valores de potencial zeta sobem drasticamente, porém, se mantém negativo. Não se sabe quais os resíduos de aminoácidos contribuem para que a carga superficial total das AuNPs seja negativa, conforme descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Potencial zeta das AuNP e suas respectivas modificações.

Amostra	Zeta 1	Zeta 2	Zeta 3
AuNP	-42,3 mV	-43,5 mV	-42,8 mV
AuNP/MUA	-45,5 mV	-45,7 mV	-42,9 mV
AuNP/Pep	-10,1 mV	-8,4 mV	-7,8 mV

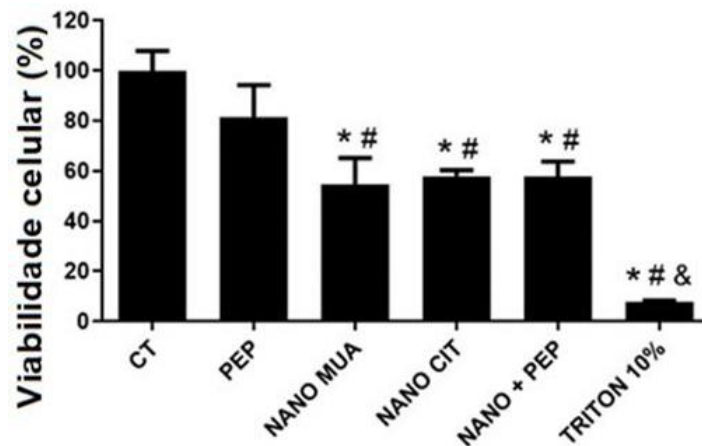
Fonte: Autor (2024).

5.6 AUNPS CONJUGADOS OU NÃO COM O PEPTÍDEO IMUNOGÊNICO PROVOCARAM DIMINUIÇÃO NA VIABILIDADE CELULAR EM BMDMS TRATADOS

Os potenciais efeitos na viabilidade celular foram avaliados em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM). As células foram expostas a concentrações específicas (1µg/mL) de cada estímulo durante 24 horas. No final da exposição, a viabilidade foi avaliada por ensaio MTT.

Conforme indicado na Figura 14, observa-se uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 40% nas amostras com AuNP independente da bioconjugação, sugerindo que as AuNP podem apresentar certa toxicidade ao tipo celular analisado.

Figura 14 – Gráfico de barras representando as AuNP modificadas e conjugada na viabilidade das células BMDM. A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução do MTT; * $p < 0,05$ em relação ao CT, # $p < 0,05$ em relação ao PEP; & $p < 0,05$ em relação ao NANO MUA, NANO CIT, NANO+PEP.

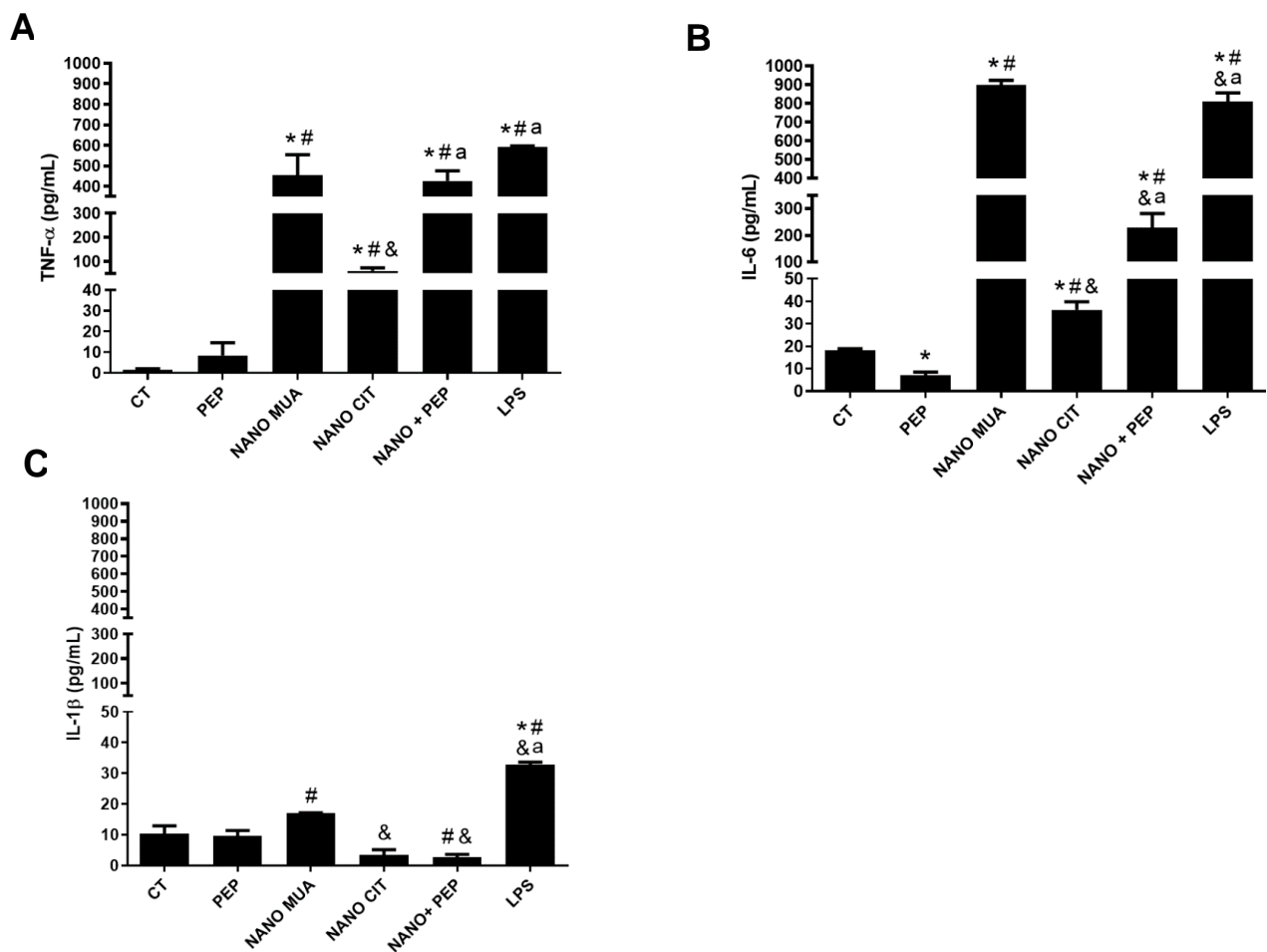


Fonte: Autor (2024).

5.7 O BIOCONJUGADO AUNP-PEPTÍDEO ESTIMULA UMA RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA MAIS PROEMINENTE DO QUE O PEPTÍDEO ISOLADO

Afim de entender se as AuNPs possam ter um papel adjuvante conforme descrito na literatura, foi feito por ELISA, a dosagem de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 presentes no sobrenadante das células que foram estimuladas. Como podemos observar na Figura 15, houve grande secreção de TNF- α e IL-6, e em menor grau, de IL-1 β em BMDMs estimuladas com AuNPs e o bioconjugado em estudo.

Figura 15 – Células BMDM produziram TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) quando estimuladas com AuNPs e o bioconjugado. * $p < 0,05$ em relação ao CT, # $p < 0,05$ em relação a Pep, & $p < 0,05$ em relação ao AuNP@MUA e ^a $p < 0,05$ em relação ao AuNP@Cit.



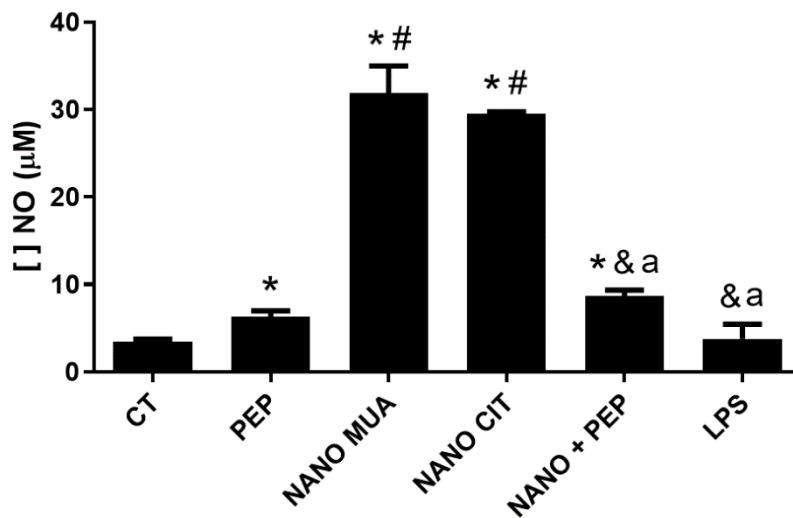
Fonte: Autor (2024).

5.8 AUNP@MUA E AUNP@CIT ESTIMULAM MAIOR PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) DO QUE O BIOCONJUGADO

Afim de avaliar a NO presente nos sobrenadantes estimulados, foi utilizado o método colorimétrico de Greiss (Schmölz; Wallert; Lorkowski, 2017). Podemos observar na Figura 16 que houve uma produção elevada de NO nas amostras com AuNP@MUA e AuNP@Cit, sugerindo um possível estresse oxidativo proporcionado

pelas AuNPs que potencialmente foi revertido quando essas AuNPs foram revestidas com o peptídeo.

Figura 16 – Células BMDM produzem NO quando estimuladas com AuNPs e o bioconjugado. * $p < 0,05$ em relação ao CT, # $p < 0,05$ em relação ao Pep, & $p < 0,05$ em relação ao AuNP@MUA e $a p < 0,05$ em relação ao AuNP@Cit.



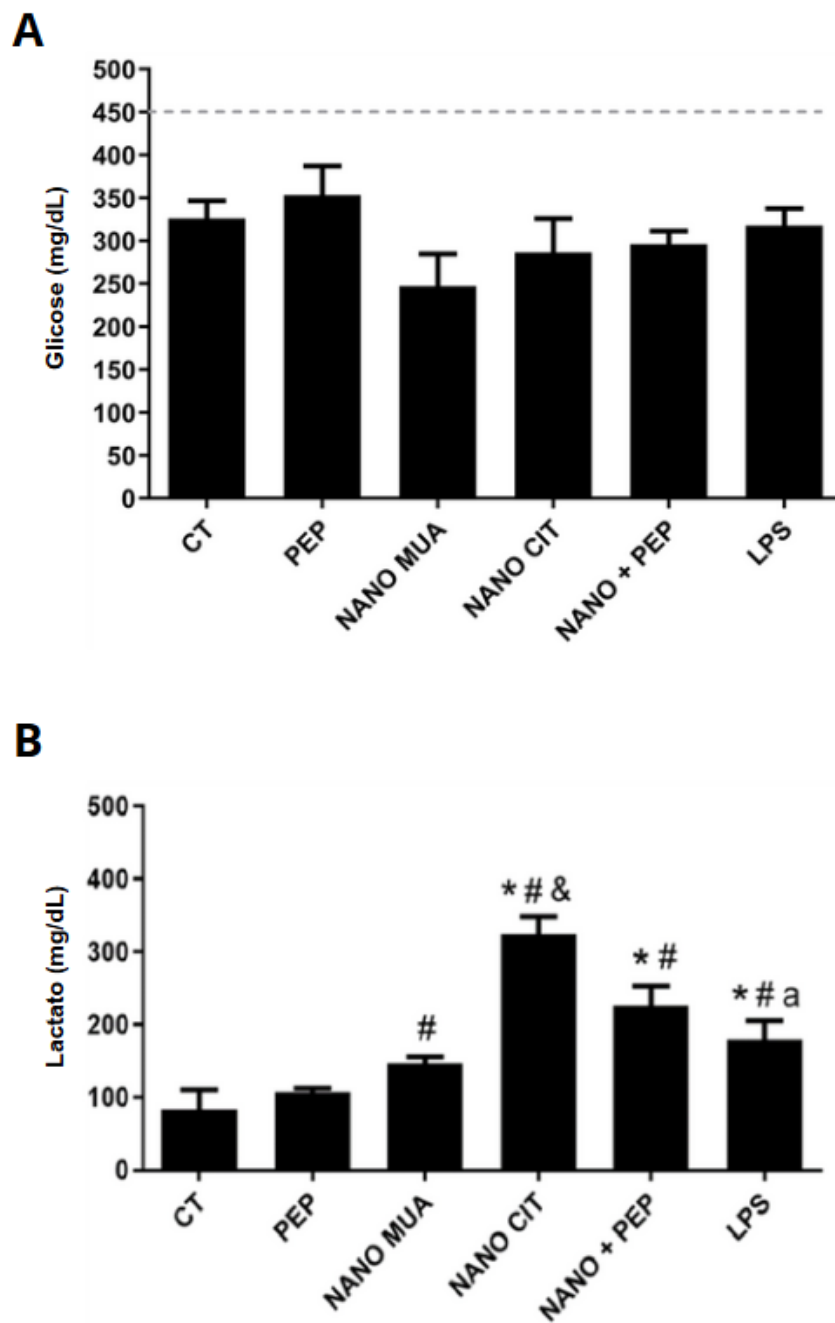
Fonte: Autor (2024).

5.9 METABOLISMO CELULAR

Afim de entender como os BMDMs gastaram energia para lidar com os estímulos, foi dosado a glicose e o lactato presentes nos sobrenadantes.

O resultado da dosagem de glicose (Figura 17-A), nos mostra que as células se ativaram a ponto de consumirem glicose do meio, onde o consumo foi de cerca de 250 mg/dL a 300mg/dL nas amostras contendo AuNPs, entretanto, não houveram diferenças significativas entre os grupos, enquanto que na dosagem de lactato, houve maior produção de lactato na amostra contendo AuNP@Cit e em menor grau na amostra do bioconjugado, conforme a Figura 17-B.

Figura 17 – Dosagem de glicose e lactato proveniente dos BMDMS após os estímulos. A) Consumo de glicose; B) Produção de lactato.



Fonte: Autor (2024).

6 DISCUSSÃO

A brucelose representa uma zoonose negligenciada de considerável relevância global, destacando-se particularmente no contexto brasileiro (De Alencar; Mota *et al.*, 2016). A estratégia predominante de controle da doença recai na vacinação dos animais. Entretanto, as vacinas atualmente disponíveis enfrentam múltiplos desafios, incluindo questões relacionadas à eficácia e segurança (Dawood *et al.*, 2023).

Neste trabalho, o peptídeo altamente imunogênico da proteína N-acetiltransferase de *Brucella abortus* cepa 2308, previamente identificado por nosso grupo de pesquisa e com capacidade de induzir uma resposta imunológica robusta, foi conjugado a nanopartículas de ouro cujo objetivo foi agir como um adjuvante para potencializar essa resposta. Tal resposta se mostrou eficiente dada a efetividade e sucesso na síntese desse bioconjugado e dos efeitos gerados em macrófagos primários na ativação de uma resposta pró-inflamatória.

Pesquisas anteriores demonstraram que AuNPs esféricas com um diâmetro médio de 15 nm são ideais para a imunização (Dykman *et al.*, 2018).

Nesse trabalho foi utilizado o método de Turkevich para a síntese de nanopartículas de ouro revestidas com citrato, devida a sua ampla utilização em nanotecnologia (Compostella *et al.*, 2017; Mateu Ferrando; Lay; Polito, 2020). O procedimento sintético empregado fornece AuNP@Cit de 15 nm com forma e tamanho controlados. Contudo, a bioconjugação covalente de um peptídeo com AuNP@MUA envolve muitas etapas e cada uma delas pode afetar a estabilidade do produto final.

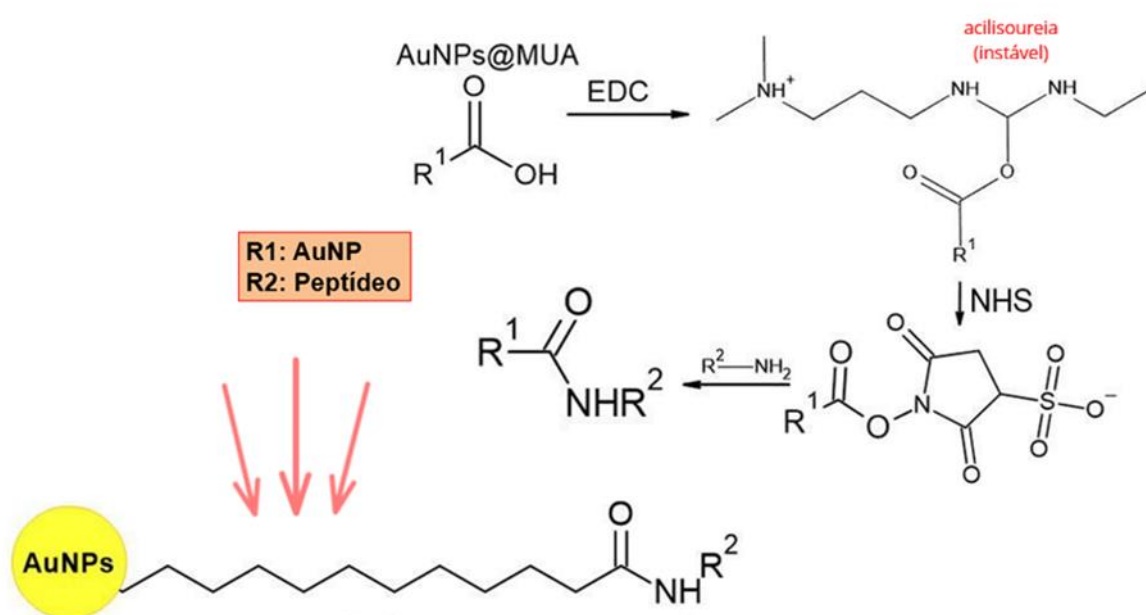
O ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) contém 11 átomos de carbono entre os grupos funcionais COOH e SH, com essa cadeia carbônica a AuNP tende a ficar mais estável, além disso no grupo funcional SH, o átomo de enxofre presente possui uma afinidade natural com o ouro e o grupo funcional COOH é funcionalizado para fazer a conjugação com o peptídeo (Laaksonen *et al.*, 2006).

O emprego combinado dos reagentes EDC/NHS com o ácido 3-mercaptopropanoico (MUA) para a conjugação de biomoléculas e matrizes inorgânicas é amplamente utilizado (Raghav; Srivastava, 2016).

Quando ocorre a imobilização, uma ligação covalente é estabelecida entre o grupo sulfeto do MUA e o ouro, liberando o radical ácido carboxílico para reagir, no qual o EDC e o NHS fazem essa reação. Inicialmente, o EDC reage com a carboxila, formando o grupo intermediário o-acilisoureira, o qual é instável e altamente reativo. Se uma amina primária estiver disponível para a reação, ela interage com o grupo carboxílico do MUA, resultando na formação de uma ligação amida e na liberação de um derivado solúvel de ureia, neste caso com o NHS adicionado, ele se une ao radical carboxílico, gerando um grupo reativo mais estável do que o o-acilisoureira permitindo o acoplamento com o peptídeo.

Assim, ao utilizar os reagentes EDC/NHS em conjunto, as carboxilas ativadas do MUA permanecem intactas até que o NHS seja substituído pelas aminas primárias das biomoléculas, esse procedimento é ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – Representação da reação EDC/NHS. Bioconjugação covalente entre AuNP@MUA@Peptídeo.



Fonte: Autor (2024).

Uma vez que o material está finalizado, é importante que a caracterização de AuNP sintetizada e suas modificações utilize de um conjunto completo de medidas experimentais, como MEVFEG, UV/VIS e DLS para descrever completamente o sistema nano particulado.

A avaliação da suspensão de nanopartículas de ouro por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) revelou que as suspensões de AuNPs obtidas apresentavam uma morfologia esférica, um tamanho uniforme e baixa polidispersividade. No UV-Vis, observou-se uma absorbância de 522nm característica de AuNP de 15 nm conforme observado por diversos grupos que pesquisaram essa NP (Cao-Milan; Liz-Marzan, 2014; Mateu Ferrando; Lay; Polito, 2020; Ghaffarlou *et al.*, 2022). Já na técnica analítica mediada pelo infravermelho FTIR, a realização da troca de ligantes foi evidenciada, onde as sobreposições de bandas, porém com aumento de intensidade do sinal, indicaram êxito na ligação das moléculas desejadas.

Quaisquer moléculas adsorvidas ou desorvidas na superfície metálica alteram o índice de refração do coloide, resultando em aumento ou redução das camadas na superfície da AuNP (Fagundez *et al.*, 2021; Ghaffarlou *et al.*, 2022).

Neste contexto, as AuNPs apresentaram mudanças em sua absorção e dispersão de luz a cada modificação dos compostos superficiais, sugerindo sucesso na ligação das moléculas desejadas, onde, a cada nova inserção de moléculas na superfície das AuNP levou ao deslocamento batocrômico da RPSL (*Resonance Peak Scattering Length*) das AuNPs.

Os deslocamentos no pico de SPR está relacionado com uma diminuição da energia das AuNPs, enquanto que a diminuição da absorbância para as AuNP/Pep está relacionado com a parte do material nas etapas de purificação.

O diâmetro das AuNPs com diferentes agentes de revestimento foi investigado pelo espalhamento de luz dinâmico (D.L.S.). Essas partículas possuem uma carga líquida não nula, o que resulta na atração de partículas com cargas opostas. Conseqüentemente, na presença de íons na água, camadas de íons positivos se formam em torno das nanopartículas, atraindo subsequentemente íons com cargas negativas. Portanto, mesmo as nanopartículas sem qualquer revestimento apresentam um tamanho médio maior do que 15 nm devido à presença dessa camada. A discrepância observada entre as nanopartículas "puras" analisadas por DLS e aquelas analisadas por MEV-FEG são atribuídas a essa camada. Por outro

lado, a diferença entre outras nanopartículas contendo MUA e o peptídeo surge da variação de tamanho, sendo que o MUA é maior que o citrato, além da contribuição do raio hidrodinâmico. O mesmo princípio se aplica ao peptídeo em relação a interação com a nanopartícula, mostrando uma variação de tamanho ainda maior.

A estabilidade coloidal também foi realizada pelo potencial zeta e os resultados da carga superficial de todas as AuNPs demonstraram valores negativos, o que são indicativos de boa estabilidade, ou seja, menor tendência de agregação (Hussein; Stephenson; Toth, 2021; Laaksonen *et al.*, 2006).

Logo, os resultados deste trabalho mostram as mudanças nas características químicas estruturais das AuNP, sugerindo êxito na conjugação com o peptídeo imunogênico, possibilitando a sua avaliação em um contexto celular.

Ao avaliar a ação do bioconjugado em macrófagos derivados da medula óssea murina, foi possível observar um certo grau de toxicidade em torno de 40% apresentado pela AuNP independente do bioconjugado. Esses valores corroboram, em partes, com a literatura, no qual é difícil um consenso sobre a viabilidade celular proporcionada pelas AuNPs.

AuNPs@Citrato podem provocar uma diminuição entre 30 a 40% na viabilidade de células alveolares A549, enquanto na linhagem celular NCIH441, também testada com as mesmas AuNPs, não ocorre qualquer tipo de alteração na sua viabilidade (Uboldi *et al.*, 2009). Foi observado viabilidade celular em células L929 na faixa de 71% a 86% após 24 horas, mas aumento para 78% a 98% após 7 dias de incubação (Yelkuvan *et al.*, 2022). Já a citotoxicidade das AuNPs aumentou com a sua concentração e a viabilidade celular diminuiu com o aumento da dose em outro estudo realizado em células L929 (Ghaffarlou *et al.*, 2022)

Também foi avaliado três linhagens de células diferentes, com várias concentrações diferentes de AuNPs, e incubadas por 24h. Foram observadas nenhuma toxicidade em células NHDFs, pequeno efeito inibitório em células HaCaTs e toxicidade em células RAW647.7, em concentrações de 80 µg/mL respectivamente (Liu *et al.*, 2020). A citotoxicidade de AuNPs associadas com peptídeos foi explorada por Sun e colaboradores utilizando AuNPs associadas ao peptídeo CALNNR8, em células HeLa, onde baixas concentrações (0,02 até 0,08 nM) não afetaram a viabilidade celular, porém com concentrações mais elevadas (0,32 nM) ocorreu a diminuição em 95% das células (Sun; Liu; Wang, 2008).

Com todos esses exemplos, conseqüentemente, percebe-se que a suscetibilidade aos efeitos citotóxicos das AuNPs e das coberturas propostas está associada às características das células e das AuNPs. Apesar do avanço no entendimento da citotoxicidade das AuNPs, as pesquisas sobre sua internalização nas células e sua relação com sua forma e tamanho ainda são limitadas. Além disso, a comparação entre os estudos disponíveis é complicada devido às diversas condições experimentais e variedade de linhagens celulares utilizados.

Deste modo, são escassos os estudos na literatura que realizaram os testes em condições idênticas às empregadas neste trabalho, especialmente utilizando células BMDM. Apesar de outras discrepâncias em relação a estudos nos quais não foi observada nenhuma diminuição na viabilidade celular, é crucial considerar que diferentes modelos celulares, utilizando células imortalizadas e amadurecidas, além de concentrações de nanopartículas e condições de cultura diferentes foram utilizados e se leva em conta que as BMDMs são células primárias, onde geralmente são consideradas menos resistentes do que as células imortalizadas, podendo influenciar os resultados observados.

Dada a característica de um potencial uso adjuvante pelas AuNPs, o sobrenadante de BMDMs foi avaliado quanto a secreção de citocinas pró-inflamatórias na presença das AuNPs bioconjugadas com o peptídeo ou não. Na literatura, é possível observar que macrófagos estimulados com bioconjugados de peptídeo com AuNPs, apresentaram elevada produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Yen; Hsu; Tsai, 2009; Rodriguez-Del Rio *et al.*, 2015). Ademais, essas citocinas pró-inflamatórias fazem parte da imunidade inata e são cruciais na defesa do organismo, possuindo vários papéis importantes e estão envolvidas na defesa contra patógenos como a *Brucella abortus* (Hop *et al.*, 2019; Guimarães *et al.*, 2020). Sendo assim, com o aumento na produção dessas citocinas pró-inflamatórias provocado pelas AuNPs analisadas no presente estudo, sugerem que elas podem ser utilizadas como adjuvantes.

A produção de citocinas pelos BMDMs estimuladas pelo bioconjugado demonstraram ser um pouco menor do que com AuNP sem conjugação, sugerindo que o bioconjugado possa ser menos agressivo, e maior do que nas amostras contendo somente o peptídeo, sendo viável como candidato vacinal e adjuvante.

Ademais, a produção de NO foi menos evidente nas amostras celulares estimuladas com o bioconjugado quando comparado aos estímulos da AuNP

associada aos componentes utilizados para obter a conjugação. Apesar do NO ser uma molécula sinalizadora crucial no organismo, pode ser produzido em resposta a estímulos inflamatórios, em determinados contextos, uma produção exacerbada de NO pode resultar em problemas adversos, incluindo inflamação crônica e estresse oxidativo (Zou *et al.*, 2018).

Logo, associado aos resultados da secreção de citocinas, é possível sugerir que o bioconjugado não está desencadeando uma resposta inflamatória excessiva ou outros efeitos adversos, o que sugere uma boa biocompatibilidade.

Para estudar o metabolismo celular e a ativação dos BMDMS, foram feitas dosagens de glicose e lactato, no qual em nossos resultados, foi indicado que as células se ativaram a ponto de haver um consumo de glicose em relação ao meio, embora não havendo diferenças significativas dentre as amostras. Contudo, uma secreção pronunciada de lactato nas amostras contendo AuNP@citrato e menos elevadas com o bioconjugado. Esse resultado indica que AuNP por si só é capaz de induzir um maior deslocamento da obtenção de energia para o processo de fermentação láctica o que promove maior ativação dos macrófagos.

Esse deslocamento metabólico possivelmente está associado a um estado pró-inflamatório (Fuchs *et al.*, 2019).

Sugerindo novamente o efeito adjuvante das AuNPs e como o bioconjugado apresentou uma produção menos excessiva, isso pode sugerir outra vez que o nosso candidato vacinal possa ter uma boa biocompatibilidade não causando danos e maiores reações adversas.

Portanto, os resultados deste estudo corroboram e expandem as evidências previamente estabelecidas na literatura científica, fortalecendo a base de conhecimento existente e sublinhando a relevância dos achados apresentados.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem sugerir a efetividade nos processos de síntese de AuNPs e sua conjugação com o peptídeo imunogênico proposto, uma certa toxicidade celular do bioconjugado e um efeito adjuvante desse composto.

As AuNPs são capazes de promover um efeito adjuvante e metabolicamente pró-inflamatório, uma vez que provocaram uma resposta em BMDMs com bastante produção de citocinas TNF- α e IL-6 e, em menor grau, IL-1 β além de maior secreção de lactato. Ao passo que o bioconjugado foi capaz de estimular uma resposta menos exacerbada na produção de NO, das citocinas pró-inflamatórias e de lactato, indicando boa biocompatibilidade do candidato vacinal.

Portanto, é prudente considerar que este trabalho abre caminho para se avaliar a ação do bioconjugado em ensaios *in vivo*, envolvendo inoculação em modelos animais e avaliação da resposta imunológica frente à AuNP associada ao peptídeo imunogênico, assim como o efeito protetor frente ao desafio com a *B. abortus*. Esses passos promoverão uma compreensão mais abrangente do potencial terapêutico e imunológico do bioconjugado proposto como uma vacina de subunidade contra a bactéria.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. J. S. *et al.* Economic analysis of vaccination to control bovine brucellosis in the states of Sao Paulo and Mato Grosso, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, n. 4, p. 351–358, 1 Mar. 2015.
- ANSAR, S. M.; CHAKRABORTY, S.; KITCHENS, C. L. pH-Responsive mercaptoundecanoic acid functionalized gold nanoparticles and applications in catalysis. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, p. 339, May 2018.
- AZNAR, M. N. *et al.* Methodology for the assessment of brucellosis management practices and its vaccination campaign: example in two Argentine districts. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 281, 7 Sept. 2017.
- BASTÚS, N. G. *et al.* Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 4, p. 743–748, Feb. 2009.
- BEHZADI, S. *et al.* Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. **Nanoscale**, v. 7, n. 12, p. 5134–5139, 12 Mar. 2015.
- BHATTACHARYA, M. *et al.* Development of epitope-based peptide vaccine against novel coronavirus 2019 (SARS-COV-2): Immunoinformatics approach. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 618–631, Feb. 2020.
- BIMLER, L. *et al.* AuNP-M2e + sCpG vaccination of juvenile mice generates lifelong protective immunity to influenza A virus infection. **Immunity & Ageing: I & A**, v. 16, p. 23, Aug. 2019.
- BLASCO, J. M. *et al.* A review of three decades of use of the cattle brucellosis rough vaccine *Brucella abortus* RB51: myths and facts. **BMC Veterinary Research**, v. 19, p. 211, 18 Oct. 2023.
- BLASCO, J. M.; MOLINA-FLORES, B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Therapeutics and control of sheep and goat diseases**. v. 27, n. 1, p. 95–104, 1 Mar. 2011.
- BLASCO, J. M.; MORENO, E.; MORIYÓN, I. Brucellosis. In **Veterinary Vaccines**. [S.l.] John Wiley, p. 295–316, Aug. 2021.
- BRANDT, W. E. *et al.* Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen1. **The Journal of Immunology**, v. 105, n. 6, p. 1565–1568, 1 Dec. 1970.
- BRIONES, G. *et al.* *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4528–4535, July 2001.
- BYNDLOSS, M. X.; TSOLIS, R. M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 111–127, Feb. 2016.

CAKSEN, H. *et al.* Childhood brucellosis is still a severe problem in the eastern region of Turkey. **Tropical Doctor**, v. 32, n. 2, p. 91–92, Apr. 2002.

CALDERÓN-GONZALEZ, R. *et al.* Pregnancy vaccination with gold glyco-nanoparticles carrying *Listeria monocytogenes* peptides protects against listeriosis and brain- and cutaneous-associated morbidities. **Nanomaterials**, v. 6, n. 8, p. 151, Aug. 2016.

CAO-MILÁN, R.; LIZ-MARZÁN, L. M. Gold nanoparticle conjugates: recent advances toward clinical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 5, p. 741–752, 1 May 2014.

CAPASSO, L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. **The Journal of Infection**, v. 45, n. 2, p. 122–127, Aug. 2002.

CÁRDENAS, L. *et al.* Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996-2014). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 3, p. 1280–1290, May 2019.

CASALINUOVO, F. *et al.* Contamination of bovine, sheep and goat Meat with *Brucella* Spp. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 3, p. 5913, 3 June 2016.

COLANGELO, E. *et al.* Characterizing self-assembled monolayers on gold nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 11–22, 18 Jan. 2017.

COMPOSTELLA, F. *et al.* Glyco-gold nanoparticles: synthesis and applications. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1008–1021, 24 May 2017.

CVETNIĆ, Ž. *et al.* Brucellosis in marine mammals, with special emphasis on the Republic of Croatia. **Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti**, v. 530, n. 44, p. 9–24, Marc. 2017.

DADAR, M. *et al.* Molecular identification of *Brucella* species and biovars associated with animal and human infection in Iran. **Veterinary Research Forum**, v. 10, n. 4, p. 315–321, Dec. 2019.

DAKTERZADA, F. *et al.* Induction of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* flagellin (1-161) using gold nanoparticles as an adjuvant. **Vaccine**, v. 34, n. 12, p. 1472–1479, 14 Mar. 2016.

DAWOOD, A. S. *et al.* Brucellae as resilient intracellular pathogens: epidemiology, host–pathogen interaction, recent genomics and proteomics approaches, and future perspectives. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, Oct. 2023.

DE ALENCAR MOTA, A. L. A. *et al.* Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 226–232, Dec. 2016.

DELPINO, M. V. *et al.* Vaccination with *Brucella* recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, n. 37, p. 6721–6729, 17 Sept. 2007.

DEMENEV, V. A. *et al.* Perfection of methodical approaches to designing vaccines against tick-borne encephalitis. **Voprosy Virusologii**, v. 41, n. 3, p. 107–110, June 1996.

DEMENTO, S. L. *et al.* Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4957–4964, June 2012.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 8, p. 469–478, Aug. 2007.

DORNELES, E. M. S. *et al.* T lymphocytes subsets and cytokine pattern induced by vaccination against bovine brucellosis employing S19 calfhood vaccination and adult RB51 revaccination. **Vaccine**, v. 32, n. 46, p. 6034–6038, 21 Oct. 2014.

DYKMAN, L. A.; KHLEBTSOV, N. G. Gold Nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. **Acta Naturae**, v. 3, n. 2, p. 34–55, Apr. 2011.

DYKMAN, L. A. *et al.* Gold nanoparticles as an adjuvant: Influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production. **International Immunopharmacology**, v. 54, p. 163–168, 1 Jan. 2018.

DYKMAN, L. A. Gold nanoparticles for preparation of antibodies and vaccines against infectious diseases. **Expert Review of Vaccines**, v. 19, n. 5, p. 465–477, 3 May 2020.

ELFAKI, M. G.; ALAIDAN, A. A.; AL-HOKAIL, A. A. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 7, p. 697–701, 30 July 2015.

EL-SAYED, A.; AWAD, W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. S31–S35, 1 Jan. 2018.

FAGÚNDEZ, P. *et al.* Systematic process evaluation of the conjugation of proteins to gold nanoparticles. **Heliyon**, v. 7, n. 6, 1 June 2021.

FOSGATE, G. T. *et al.* Isolation of *Brucella abortus* biovar 1 from cattle and water buffaloes on Trinidad. **The Veterinary Record**, v. 151, n. 9, p. 272–273, 31 Aug. 2002.

FRANC, K. A. *et al.* Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. **BMC public health**, v. 18, n. 1, p. 125, 11 Jan. 2018.

FUCHS, A. L. *et al.* Quantitative ¹H NMR metabolomics reveal distinct metabolic adaptations in human macrophages following differential activation. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 248, Nov. 2019.

GAROFOLO, G. *et al.* Origins and global context of *Brucella abortus* in Italy. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 28, 2 Feb. 2017.

GHAFFARLOU, M. *et al.* Green and facile synthesis of pullulan-stabilized silver and gold nanoparticles for the inhibition of quorum sensing. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 2, p. 517–527, 21 Feb. 2022.

GHANBARI, M. K. *et al.* One health approach to tackle brucellosis: a systematic review. **Tropical Medicine and Health**, v. 48, n. 1, p. 86, 20 Oct. 2020.

GHEIBI, A. *et al.* Development of new generation of vaccines for *Brucella abortus*. **Heliyon**, v. 4, n. 12, p. e01079, 26 Dec. 2018.

GŁOWACKA, P. *et al.* *Brucella* – Virulence factors, pathogenesis and treatment. **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 151–161, June 2018.

GODFROID, J.; NIELSEN, K.; SAEGERMAN, C. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. **Croatian Medical Journal**, v. 51, n. 4, p. 296–305, Aug. 2010.

GREGORY, A. E. *et al.* A gold nanoparticle-linked glycoconjugate vaccine against *Burkholderia mallei*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 447–456, Feb. 2015.

GUIMARÃES, E. S. *et al.* Lack of interleukin-6 affects IFN- γ and TNF- α production and early in vivo control of *Brucella abortus* infection. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1040, Dec. 2020.

GUPTA, S. *et al.* A combined subunit vaccine comprising BP26, Omp25 and L7/L12 against brucellosis. **Pathogens and Disease**, v. 77, n. 8, p. ftaa002, 1 Nov. 2019.

HALLING, S. M. *et al.* Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 8, p. 2715–2726, Apr. 2005.

HASANJANI ROUSHAN, M. R.; EBRAHIMPOUR, S. Human brucellosis: An overview. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 6, n. 1, p. 46–47, Feb. 2015.

HOP, H. T. *et al.* Immunization of BALB/c mice with a combination of four recombinant *Brucella abortus* proteins, AspC, Dps, InpB and Ndk, confers a marked protection against a virulent strain of *Brucella abortus*. **Vaccine**, v. 36, n. 21, p. 3027–3033, 17 May 2018.

HOP, H. T. *et al.* Interleukin 6 promotes *Brucella abortus* clearance by controlling bactericidal activity of macrophages and CD8+ T cell differentiation. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 11, p. 10.1128/iai.00431-19, 18 Oct. 2019.

HULL, N. C.; SCHUMAKER, B. A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 8, n. 1, p. 1500846, July 2018.

HUY, T. X. N. *et al.* Immunogenicity and protective response induced by recombinant *Brucella abortus* proteins Adk, SecB and combination of these two recombinant proteins against a virulent strain *B. abortus* 544 infection in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 143, p. 104137, 1 June 2020.

JAIN, S.; AFLEY, P.; KUMAR, S. Immunological responses to recombinant cysteine synthase A of *Brucella abortus* in BALB/c mice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 907–913, 1 May 2013.

KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. *et al.* Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 15, p. 6401–6408, 1 Aug. 2010.

KHEIROLLAHPOUR, M. *et al.* Nanoparticles and vaccine development. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 6–21, June 2020.

KHURANA, S. K. *et al.* Bovine brucellosis – a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 61–88, 15 Dec. 2021.

KIM, W. K. *et al.* Comparison between immunization routes of live attenuated *Salmonella Typhimurium* strains expressing BCSP31, Omp3b, and SOD of *Brucella abortus* in Murine Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, Apr. 2016.

KIREEV, M. N. *et al.* Studying the immunogenic properties of plague microbe capsule antigen F1 conjugated with nanoparticles of colloid gold and silver. **Problems of Particularly Dangerous Infections**, v. 0, n. 2(96), p. 43–45, 20 Apr. 2008.

LAGES, C.; MÉNDEZ, E. Contact angle measurements under thermodynamic equilibrium conditions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, n. 8, p. 1689–1692, 1 Aug. 2007.

LALSIAMTHARA, J.; LEE, J. H. Development and trial of vaccines against *Brucella*. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, n. S1, p. 281–290, 31 Aug. 2017.

LALSIAMTHARA, J.; WON, G.; LEE, J. H. Effect of immunization routes and protective efficacy of *Brucella* antigens delivered via *Salmonella* vector vaccine. **Journal of Veterinary Science**, v. 19, n. 3, p. 416–425, 1 May 2018.

LI, X.; WANG, X.; ITO, A. Tailoring inorganic nanoadjuvants towards next-generation vaccines. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 13, p. 4954–4980, 2 July 2018.

LINDAHL-RAJALA, E. *et al.* Detection and characterization of *Brucella* spp. in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, Mar. 2017.

LIU, J.; LU, Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 246–252, June 2006.

LIU, Y. *et al.* Intracellular synthesis of gold nanoparticles by gluconacetobacter liquefaciens for delivery of peptide CopA3 and ginsenoside and anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated macrophages. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 777–788, 1 Jan. 2020.

LUCARELLI, M. *et al.* Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. **European Cytokine Network**, v. 15, n. 4, p. 339–346, Dec. 2004.

MAMO, T.; POLAND, G. Nanovaccinology: The next generation of vaccines meets 21st century materials science and engineering. **Vaccine**, v. 30, p. 6609–11, 19 Oct. 2012.

MANEA, F. *et al.* Multivalent, saccharide-functionalized gold nanoparticles as fully synthetic analogs of type A *Neisseria meningitidis* antigens. **Advanced Materials**, v. 20, n. 22, p. 4348–4352, Nov 2008.

MANTUR, B. G. *et al.* Childhood brucellosis--a microbiological, epidemiological and clinical study. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 50, n. 3, p. 153–157, June 2004.

MASJEDIAN JEZI, F. *et al.* Immunogenic and protective antigens of *Brucella* as vaccine candidates. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, p. 29–36, Aug. 2019.

MATEU FERRANDO, R.; LAY, L.; POLITO, L. Gold nanoparticle-based platforms for vaccine development. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 38, p. 57–67, 1 Dec. 2020.

MCDERMOTT, J. J.; ARIMI, S. M. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1–4, p. 111–134, 20 Dec. 2002.

MEGID, J. *et al.* Isolation of *Brucella abortus* from cattle and water buffalo in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 156, n. 5, p. 147–148, 29 Jan. 2005.

MEMISH, Z. A.; BALKHY, H. H. Brucellosis and international travel. **Journal of Travel Medicine**, v. 11, n. 1, p. 49–55, Jan. 2004.

MEYER, M. E. Evolution and taxonomy in the genus *Brucella*: concepts on the origins of the contemporary species. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 199–202, Feb. 1976.

MORENO, E. *et al.* *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 7, p. 3569–3576, July 1990.

MU, Q. *et al.* Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7740–7781, 13 Aug. 2014.

MUDUNKOTUWA, I. A.; MINSHID, A. A.; GRASSIAN, V. H. ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid-solid interface in environmentally and biologically relevant media. **The Analyst**, v. 139, n. 5, p. 870–881, 1 Mar. 2014.

MURUATO, L. A. *et al.* Use of reverse vaccinology in the design and construction of nanoglycoconjugate vaccines against *Burkholderia pseudomallei*. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 24, n. 11, p. e00206-17, Nov. 2017.

NICOLETTI, P. A short history of brucellosis. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1–4, p. 5–9, 20 Dec. 2002.

O'CALLAGHAN, D. Human brucellosis: recent advances and future challenges. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 101, 23 July 2020.

OLIVEIRA, K. C. *et al.* Epitope-based vaccine of a *Brucella abortus* putative small RNA target induces protection and less tissue damage in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 12, Dec. 2021.

OLSEN, S. C.; STOFFREGEN, W. S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 6, p. 915–928, Dec. 2005.

OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; CUI, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1095–1107, 1 Sept. 2010.

PAPPAS, G. *et al.* The new global map of human brucellosis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 91–99, Feb. 2006.

PATRA, A. *et al.* Component-specific analysis of plasma protein corona formation on gold nanoparticles using multiplexed surface plasmon resonance. **Small**, v. 12, n. 9, p. 1174–1182, Mar. 2016.

PAUL, S. *et al.* Recombinant outer membrane protein 25c from *Brucella abortus* induces Th1 and Th2 mediated protection against *Brucella abortus* infection in mouse model. **Molecular Immunology**, v. 99, p. 9–18, 1 July 2018.

PIZZA, M. *et al.* Identification of vaccine candidates against serogroup *B meningococcus* by whole-genome sequencing. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5459, p. 1816–1820, 10 Mar. 2000.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; SANTOS, R. L. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 32, n. 1, p. 105–115, Apr. 2013.

POLITO, L. 11 - Glyconanoparticles as versatile platforms for vaccine development: A minireview. *In*: RAUTER, A. P. *et al.* (Eds.). **Recent Trends in Carbohydrate Chemistry**. [S.l.] Elsevier, p. 381–411, May. 2020.

RABKIN, A. *et al.* New nanocrystalline materials: A Previously unknown simple cubic phase in the SnS binary system. **Nano Letters**, v. 15, n. 3, p. 2174–2179, 11 Mar. 2015.

RAGHAV, R.; SRIVASTAVA, S. Immobilization strategy for enhancing sensitivity of immunosensors: L-Asparagine–AuNPs as a promising alternative of EDC–NHS activated citrate–AuNPs for antibody immobilization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 78, p. 396–403, 15 Apr. 2016.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445–450, 1 Oct. 2000.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, Dec. 2013.

RODRIGUEZ-DEL RIO, E. *et al.* A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. **Vaccine**, v. 33, n. 12, p. 1465–1473, 17 Mar. 2015.

SAENMUANGCHIN, R.; SIRIPINYANOND, A. flow field-flow fractionation for hydrodynamic diameter estimation of gold nanoparticles with various types of surface coatings. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 26, p. 6845–6859, 1 Oct. 2018.

SANCHEZ-VILLAMIL, J. I.; TAPIA, D.; TORRES, A. G. Development of a gold nanoparticle vaccine against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 10.1128/mbio.01869-19, 13 Aug. 2019.

SANZ, C. G. *et al.* Bioconjugates of mercaptocarboxylic acids functionalized AuNP and superoxide dismutase for superoxide electrochemical monitoring. **Microchimica Acta**, v. 189, n. 7, p. 245, 8 June 2022.

SCHMÖLZ, L.; WALLERT, M.; LORKOWSKI, S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 449, p. 68–70, Oct. 2017.

SCHURIG, G. G.; SRIRANGANATHAN, N.; CORBEL, M. J. Brucellosis vaccines: past, present and future. **Veterinary Microbiology**, v. 90, n. 1–4, p. 479–496, 20 Dec. 2002.

SENGUPTA, A. *et al.* Efficacy and immune response elicited by gold nanoparticle-based nanovaccines against infectious diseases. **Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 505, 24 Mar. 2022.

SHIOSAKA, S. *et al.* A new method for producing a specific and high titre antibody against glutamate using colloidal gold as a carrier. **Brain Research**, v. 382, n. 2, p. 399–403, 24 Sept. 1986.

SMITH, L. D.; FICHT, T. A. Pathogenesis of *Brucella*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 209–230, Sept. 2008.

SRIRANGANATHAN, N. *et al.* *Brucella*. In NENE, V.; KOLE, C. (Eds.). **Genome Mapping and Genomics in Animal-Associated Microbes**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 1–64, June 2009.

STAROVEROV, S. A. *et al.* Generation of antibodies to *Yersinia pseudotuberculosis* antigens using the colloid gold particles as an adjuvant. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Immunobiologii**, n. 3, p. 54–57, May 2003.

STAROVEROV, S. A. *et al.* Effect of gold nanoparticles on the respiratory activity of peritoneal macrophages. **Gold Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 153–156, 1 June 2009.

STAROVEROV, S. A.; DYKMAN, L. A. Use of gold nanoparticles for the preparation of antibodies to tuberculin, the immunoassay of mycobacteria, and animal vaccination. **Nanotechnologies in Russia**, v. 8, n. 11–12, p. 816–822, Nov. 2013.

SULCZEWSKI, F. B. *et al.* Nanoparticle vaccines against viral infections. **Archives of Virology**, v. 163, n. 9, p. 2313–2325, 1 Sept. 2018.

SUN, J.; ZHANG, J.; JIN, Y. 11-mercaptoundecanoic acid directed one-pot synthesis of water-soluble fluorescent gold nanoclusters and their use as probes for sensitive and selective detection of Cr³⁺ and Cr⁶⁺. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 1, p. 138–143, 29 Nov. 2012.

SUN, L.; LIU, D.; WANG, Z. Functional gold nanoparticle-peptide complexes as cell-targeting agents. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 24, n. 18, p. 10293–10297, 16 Sept. 2008.

TADEPALLI, G. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of *Brucella abortus* recombinant protein cocktail (rOmp19+rP39) against *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16M infection in murine model. **Molecular Immunology**, v. 71, p. 34–41, 1 Mar. 2016.

TIAN, M. *et al.* Characterization of the main immunogenic proteins in *Brucella* infection for their application in diagnosis of brucellosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 70, p. 101462, 1 June 2020.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 0, p. 55–75, 1 Jan. 1951.

UBOLDI, C. *et al.* Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 18, 22 June 2009.

UGALDE, R. A. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 14, p. 1211–1219, Dec. 1999.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *In*: CREE, I. A. (Ed.). **Cancer Cell Culture: methods and protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, Mar. 2011, p. 237–245.

VASSALLO, D. J. The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. **Journal of the Royal Army Medical Corps**, v. 138, n. 3, p. 140–150, Oct. 1992.

VERMA, S. K.; JAIN, S.; KUMAR, S. Immunogenicity and protective potential of a bacterially expressed recombinant dihydrolipoamide succinyltransferase (rE2o) of

Brucella abortus in BALB/c mice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2487–2495, 1 July 2012.

WANG, W. *et al.* Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 541–548, 1 Dec. 2016.

WARETH, G. *et al.* Animal brucellosis in Egypt. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 11, p. 1365–1373, 13 Nov. 2014.

WHATMORE, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, Includes papers from the Special Issue “Parasitology in Mexico”. v. 9, n. 6, p. 1168–1184, 1 Dec. 2009.

WYATT, H. V. Royal Navy surgeons and the transmission of brucellosis by goats' milk. **Journal of the Royal Naval Medical Service**, v. 85, n. 2, p. 112–117, Oct. 1999.

YADAV, H. K. S. *et al.* Nanovaccines formulation and applications-a review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 380–387, 1 Apr. 2018.

YELKUVAN EM, ERDEMLI Ö, YILMAZ B, AKTÜRK Ö. Evaluation of photochemically cross-linked collagen/gold nanoparticle, **Turk J Chem.** **2022**, v. 1, p. 101–115, 8 Oct. 2022.

YEN, H.-J.; HSU, S.; TSAI, C.-L. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. **Small**, v. 5, n. 13, p. 1553–1561, July 2009.

ZONG, J.; COBB, S. L.; CAMERON, N. R. Peptide-functionalized gold nanoparticles: versatile biomaterials for diagnostic and therapeutic applications. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 5, p. 872–886, 2 May 2017.

ZOU, Y.-H. *et al.* Anti-inflammatory sesquiterpenoids from the traditional chinese medicine salvia plebeia: Regulates pro-inflammatory mediators through inhibition of NF- κ B and Erk1/2 signaling pathways in LPS-induced Raw264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 95–106, 10 Jan. 2018.