

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Mafalda Videira pela oportunidade que me deu de trabalhar consigo, pela sua orientação, ajuda, disponibilidade, pelas críticas relevantes e sugestões construtivas feitas durante orientação da presente tese e também ao longo dos anos de Faculdade, e pelo seu apoio constante e a sua amizade.

À Professora Doutora Madalena Pimentel, pela oportunidade que me deu e pela forma como me recebeu no seu grupo de trabalho, pela orientação, ajuda, disponibilidade, apoio e pelas críticas construtivas e sugestões que me deu durante a orientação desta tese de mestrado e também durante todos os anos de Faculdade.

À Professora Doutora Ana Cristina Santos e Dra. Cláudia, da FMUC-IBILI, pela hospitalidade e disponibilidade com que me receberam e pela ajuda indispensável que me ofereceram durante uma fase importante desta tese.

À Professora Doutora Elsa Anes o meu agradecimento pela possibilidade dada em executar uma fase muito importante e decisiva para a realização deste trabalho experimental e pela disponibilidade e apoio científico.

À Professora Doutora Isabel Portugal o meu agradecimento pela possibilidade dada para executar uma fase importante deste trabalho e pela sua disponibilidade.

Ao Professor Doutor Luís Gouveia o meu agradecimento pela ajuda na elaboração gráfica de alguns resultados.

À Marta Simões e à Filipa Gil pelo apoio constante, incentivo e ajuda incondicionais que sempre me disponibilizaram durante todo o percurso para execução desta tese.

Às/aos colegas de mestrado: Maria Eloy, Cátia Caneira, Paula Cerejo, João Carreira, André, Catarina Gouveia, Gilberto Couto, Ana Rita Duarte, Suraya Diaz, Rita Moura, Maria

Espírito Santo pelo grupo unido que embora de áreas divergentes acabámos por formar e pelo espírito de ajuda que criámos durante o primeiro ano de mestrado.

Aos meus pais maravilhosos, o meu orgulho e exemplo para toda a vida, pela motivação, apoio, compreensão, carinho, paciência com que sempre me ajudaram a ultrapassar e vencer todos os momentos e etapas fáceis e difíceis da minha vida.

À minha irmã e avó Joaquina, que tanto adoro, pelo apoio incondicional, ajuda e paciência que sempre me dispensaram.

Ao meu marido pela sua paciência nos momentos mais difíceis deste longo caminho académico, pelo seu apoio incondicional em todos estes momentos, pelo carinho e amor que me oferece diariamente.

A toda a equipa da Farmácia da Terrugem, Dra. Helena Correia, Dr. José Sousa, Dra. Cátia Lapa, Dra. Catarina Paula, Catarina Pereira, Filipa Goís, D. Lina, Sr. Francisco Correia, acima de tudo pela amizade, mas também pelo apoio, disponibilidade, companheirismo e paciência, mesmo nos dias menos bem-humorados, que sempre tiveram comigo.

Ao trio do Cacém e arredores, Nila, Sílvia e Inês por estarem sempre comigo, por me apoiarem mais uma vez, mas principalmente pelo privilégio da vossa amizade.

Aos meus padrinhos, Carlos e Isabel; aos meus tios; à minha prima Ana; à minha avó Maria e aos meus sogros por acreditarem em mim e me apoiarem sempre ao longo da minha vida, o meu profundo agradecimento.

A todas as pessoas que não citei e que, directa ou indirectamente, me ajudaram e tornaram possível a execução desta tese, um muito obrigado.

**RESUMO**

O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente patogénico da Tuberculose. Uma das suas principais características está relacionada com a sua capacidade de sobrevivência no interior dos macrófagos. Muito embora a eficácia e tolerância dos fármacos disponíveis não esteja em questão, o desenvolvimento de resistências e a falta de selectividade para as células-alvo revela-se cada vez mais preocupante. A terapêutica actual prolonga-se por longos períodos de tempo e requer a administração contínua e repetida de doses elevadas de fármacos. Este facto, em conjunto com os efeitos tóxicos, relacionados sobretudo com a administração sistémica, contribui para a falta de adesão dos doentes à terapêutica. É urgente o desenvolvimento de novos fármacos ou o desenvolvimento de sistemas que permitam a libertação modificada dos mesmos. As nanopartículas lipídicas (nsLp) são formulações farmacêuticas com um elevado potencial para direccionar e manter a concentração farmacológica nos tecidos-alvo, reduzindo desta forma os efeitos sistémicos dos fármacos incorporados.

Neste trabalho desenvolveu-se um sistema lipídico-coloidal (nsLp), como transportador da proteína LysB, uma proteína obtida por indução da sua expressão em *E. coli* recombinante (pMP302), que demonstrou ser eficaz na inibição do crescimento bacteriano de culturas de *Mycobacterium smegmatis*. A investigação realizada em culturas de *Mycobacterium smegmatis* e em macrófagos infectados com o mesmo agente bacteriano permitiram avaliar o efeito da incorporação da LysB em nanopartículas lipídicas, nomeadamente, na sua estrutura e actividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos demonstraram que o sistema nsLp\_LysB é mais eficaz que a proteína na sua forma livre para a inibição do crescimento bacteriano de *Mycobacterium smegmatis*, o que pode estar relacionado com a internalização celular facilitada das partículas

---

endocitáveis. O sistema nsLp\_LysB funciona assim como um transportador eficaz da proteína para células fagocitárias.

A utilização de proteínas fágicas com propriedades lipolíticas como agentes terapêuticos da Tuberculose revela-se uma hipótese interessante. No entanto é necessário garantir a vectorização destas biomoléculas à sua célula-alvo. A utilização das nsLp com este objectivo terapêutico revela-se uma inovação tecnológica de sucesso, uma vez que estas têm sido descritas como transportadores selectivos de fármacos para o tratamento de doenças pulmonares.

**Palavras-Chave:** Agente antimicrobiano; *Mycobacterium smegmatis*; veiculação selectiva; nanopartículas lipídicas; proteínas líticas; Terapêutica direccionada; LysB; nsLp\_LysB.

**ABSTRACT**

The pathogen of tuberculosis is *Mycobacterium tuberculosis*. One of its main characteristics is related to the ability of survival within macrophages. Although the drugs currently available are relatively well tolerated and effective, the development of resistance and difficulty in reaching the target cells (alveolar macrophages) is increasingly worrying. The current treatment extends over long periods of time and requires the continuous and repeated administration of high doses of drugs. Furthermore, the toxic side effects related to the systemic administration also promote a non-adherence of patients to therapy. It is urgent to develop new drugs or to develop systems that allow the modified release of same. Lipid nanoparticles (nsLp) are one of the systems under development with a high potential to increase and maintain the local concentration of drugs in target tissues, thus reducing its systemic effects in the blended drugs.

The aim of this work is the development of a lipid-colloidal (nsLp) as a carrier of a protein (LysB) that has proved being effective in inhibiting the growth of bacterial cultures of *Mycobacterium smegmatis*. Thus, testing is carried out in cultures of *Mycobacterium smegmatis* and in macrophages infected with the same bacterial agent in order to check whether the effect of the free protein remained with the application of the nsLp\_LysB system.

The results showed that the nsLp\_LysB system is equally or more effective than the protein in its free form for the inhibition of bacterial growth of *Mycobacterium smegmatis*, which could be related with the easy cellular internalization of the endocytic particles. Therefore the nsLp\_LysB system is a good carrier of this protein to phagocytic cells.

The use of phagic proteins with lipolytic properties as therapeutic agents of tuberculosis appears to be an interesting hypothesis. However it is necessary to ensure the targeting of

---

biomolecules to their target organ. The use of nsLp with this therapy appears to be a technological innovation of success, as these have been described as excellent carriers of drugs via inhalation for the treatment of lung diseases.

**Key Words:** Antimicrobial agent, *Mycobacterium smegmatis*; drug delivery system; lipid nanoparticles; lytic proteins, targeted therapy; LysB; nsLp\_LysB.

**ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxiribonucleíco
AESBF	4-(2-Aminoethyl) benzenezulfonyl fluoride hydrochloride
APS	Ammonium persulfate
ARN	Ácido ribonucleíco
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BSA	Soro de Albumina bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CDC	Center for Disease Control
cm	centímetros
<i>dm</i>	diâmetro médio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO <sub>600</sub>	Densidade óptica, medida a 600 nm
dsADN	ADN de cadeia dupla
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	grama
h.	Horas
<i>hol</i>	gene da holina
IP	Índice de polidispersão
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
L	litro

---

LB	<i>Luria-Bertani broth</i>
LPS	Lipopolissacárido
<i>lysA</i>	gene da endolisina do fago Ms6
<i>lysB</i>	gene da enzima lipolítica do fago Ms6
MDR-TB	Tuberculose Multirresistente
min.	minutos
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mg	miligrama
mM	milimolar
ml	mililitro
m.o.i.	Multiplicidade de infecção, multiplicity of infection
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NLC	<i>Nanostructure Lipid Carriers</i>
nsLp	<i>nanosemisolid lipid particles</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
p.f.	ponte de fusão
PFA	Paraformaldeído
r.p.m	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	dodecil sulfato de sódio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS

---

SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticles</i>
TB	Tuberculose
TLC	Cromatografia de camada fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
UFC	Unidades formadoras de colónias
µg	micrograma
µl	microlitro
VACs	Vias aéreas de condução
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana.
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente

---

**ÍNDICE**

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO .....	III
ABSTRACT .....	V
ABREVIATURAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XVII
Capítulo 1. Introdução .....	1
1.1. Tuberculose .....	1
1.1.1. Epidemiologia .....	1
1.1.2. Biologia e Infecção do <i>M. tuberculosis</i> .....	2
1.1.3. Fisiopatologia .....	3
1.1.4. Terapêutica .....	5
1.2. Bacteriófagos .....	10
1.2.1. Micobacteriófagos .....	13
1.3. Nanomedicina .....	14
1.3.1. Sistemas de veiculação de fármacos .....	15
1.3.2. nsLp .....	18
1.4. Macrófagos alveolares como alvo de terapêuticas intracelulares .....	19
1.5. Administração Pulmonar .....	20
1.5.1. O pulmão como via de administração de sistemas coloidais para o tratamento da TB .....	22

---

1.6. Objectivos.....	28
Capítulo 2. Material e Métodos.....	29
2. 1. Estirpes Bacterianas e Bacteriófagos .....	29
2. 1.1. Condições de crescimento.....	30
2. 2. Produção da proteína LysB .....	30
2. 2.1. Expressão e Purificação de LysB em <i>E. coli</i> .....	30
2. 2.2. Actividade Biológica da LysB .....	33
2. 3. Produção das Nanopartículas (nsLp).....	33
2. 3.1. Preparação das Nanopartículas.....	34
2. 3.2. Caracterização das Nanopartículas.....	36
2. 4. Produção do sistema nsLp_LysB .....	37
2. 4.1. Eficiência da adsorção.....	37
2. 4.2. Determinação do diâmetro médio do sistema nsLp_LysB.....	37
2. 5. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp_LysB.....	37
2. 5.1. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp_LysB em culturas de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 .....	37
2. 5.2. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp_LysB em linhas celulares de macrófagos infectados com <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 .....	38
2. 6. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp_LysB em macrófagos peritoneais infectados com <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 .....	42
2. 7. Estudo da actividade Biológica do sistema nsLp_LysB em culturas de <i>M. tuberculosis</i> .....	45

---

---

2. 8.	Extracção de Lípidos Totais das micobactérias .....	46
2. 9.	Acção de LysB e nsLp nos lípidos totais das micobactérias.....	46
Capítulo 3.	Resultados e Discussão.....	47
3.1.	Produção da proteína LysB .....	47
3. 1.1.	Purificação da LysB .....	47
3. 1.2.	Efeito da LysB no crescimento de <i>M. smegmatis</i> .....	48
3.2.	Adsorção da LysB em nsLp .....	51
3.3.	Actividade Biológica do sistema nsLp_LysB .....	54
3. 3.1.	Estudo da actividade de nsLp_LysB em culturas de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 .....	54
3. 3.1.	Avaliação da actividade de nsLp_LysB na viabilidade de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	57
3. 3.2.	Estudo da actividade de nsLp_LysB em linhas celulares de macrófagos.....	62
3.4.	Estudo da actividade biológica do sistema nsLp_LysB em culturas de <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> .....	75
3.5.	Extracção de Lípidos Totais das micobactérias .....	76
Capítulo 4.	Conclusão e .....	79
Perspectivas Futuras.....		79
Bibliografia.....		83

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura da parede celular de uma micobactéria. Adaptado de Murray <i>et al</i> , 2005 <sup>(93)</sup> .....	3
Como referido anteriormente, a maior percentagem de infecções permanece em fase latente durante a vida do indivíduo, no entanto, em alguns casos a progressão para TB activa ocorre num curto espaço de tempo (Figura 1.2) <sup>(155)</sup> .....	5
Figura 1.2- Evolução da infecção pelo <i>M. tuberculosis</i> ao longo do tempo. A maior percentagem de infecções permanece em fase latente durante toda a vida do indivíduo. Alguns doentes podem apresentar uma rápida progressão de TB latente para TB activa ou mesmo para TB com sintomas extra-pulmonares (5 a 10% do total de casos) Retirado de Young <i>et al.</i> , 2006 <sup>(155)</sup> .....	5
Figura 1.3 – Representação esquemática onde estão representados os países que, até Setembro de 2009, reportaram pelo menos um caso de XDR-TB. Retirado de OMS <sup>(99)</sup> .....	9
Figura 1.4 – ❶ Ciclo Lítico de um Bacteriófago. A. Adsorção do fago aos receptores da célula hospedeira e penetração do material genético; B. Degradação do genoma da célula hospedeira; C. Replicação do ADN fágico; D. Formação dos diferentes componentes das partículas fágicas; E. Introdução do ADN fágico na cápside; F. G. Formação das novas partículas fágicas; H. Lise da célula hospedeira e libertação dos fagos produzidos. ❷ Ciclo lítico e lisogénico de um bacteriófago. No ciclo lisogénico, o genoma fágico é integrado no genoma da célula hospedeira. Adaptado de Kropinski, 2006 <sup>(79)</sup> .....	12

---

Figura 1.5 – Mecanismo de acção de transportadores submicrométricos, lipossomas e nanopartículas, com moléculas activas encapsuladas sobre o seu alvo específico, agentes patogénicos intracelulares. Adaptado de Pinto-Alphandary <i>et al</i> , 2000 <sup>(113)</sup> . .....	20
Figura 2.1 – Representação esquemática do sistema operativo utilizado para a preparação de dispersões coloidais de partículas lípidicas-nsLp. Retirado de Videira, 2008 <sup>(144)</sup> . .....	35
Figura 2.2 – Câmara fechada utilizada para sacrifício do animal por <i>overdose</i> anestésica com clorofórmio. ....	42
Figura 2.3 – Recolha dos macrófagos peritoneais após o sacrifício do animal por <i>overdose</i> anestésica com clorofórmio. (A) Injecção de PBS na cavidade abdominal do ratinho. (B) Colheita do líquido peritoneal. ....	43
Figura 3.1 – SDS-PAGE das fracções ímpares recolhidas na purificação de LysB. O gel foi corado com azul de <i>comassie</i> . Os pesos moleculares do marcador encontram-se indicados à direita. À esquerda aparece a indicação da proteína LysB com o peso molecular esperado (37kDa). ....	47
Figura 3.2 - Curva de calibração da proteína BSA obtida pelo método de <i>Bradford</i> . ....	48
Figura 3.3 - Variação da DO <sub>600</sub> das culturas de <i>M. smegmatis</i> (com 120 µg/ml de LysB e sem proteína), na presença de Tween 80 durante 24h. ....	49
Figura 3.4 - Variação da DO <sub>600</sub> das culturas de <i>M. smegmatis</i> (com 120 µg/ml de LysB e sem proteína), na presença de Brij 35 durante 24h. ....	50
Figura 3.5 – Valor do diâmetro médio das partículas dispersas em função da percentagem de Lípido. ....	52

---

---

Figura 3.6 – Variação da DO <sub>600</sub> das culturas de <i>M. smegmatis</i> por adição de diferentes concentrações de nsLp ao sistema nsLp_LysB (120 µg/ml de proteína). O ensaio realizou-se na presença de Brij 35. ....	55
Figura 3.7 – Variação da DO <sub>600</sub> das culturas de <i>M. smegmatis</i> por adição da proteína livre (120 µg/ml de LysB) a culturas com Tween 80 e com Brij 35e por adição de nsLp vazias, e do sistema nsLp_LysB em culturas com Brij 35, durante 24h. ....	56
Figura 3.8 – Avaliação do efeito dos sistemas nsLp, LysB, nsLp_LysB e [nsLp_LysB]/2 em <i>M. smegmatis</i> por contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC), em meio 7H9 com adição de Tween 80. ....	58
Figura 3.9 – Avaliação do efeito dos sistemas nsLp, LysB, nsLp_LysB e [nsLp_LysB]/2 em <i>M. smegmatis</i> por contagem do número UFC, em meio 7H9 com adição de Brij 35. ....	59
Figura 3.10 – Avaliação do efeito dos sistemas nsLp, LysB, nsLp_LysB e [nsLp_LysB]/2 em <i>M. smegmatis</i> por contagem do número de UFC, em meio 7H9. ....	60
Figura 3.11 – ❶ Variação das UFC de <i>M. smegmatis</i> , com a adição de nsLp_LysB, ao longo do tempo do ensaio, na presença e ausência de Brij 35 no meio. ❷ Variação das UFC de <i>M. smegmatis</i> , pela adição de nsLp_LysB e [nsLp_LysB]/2 ao longo do tempo do ensaio, em meio 7H9 com adição de Brij 35. ....	61
Figura 3.13 – Imagens obtidas ao microscópio de fluorescência por coloração, do citoesqueleto de actina de macrófagos, com rodamina-faloidina após 1h e 24h de contacto com os sistemas nsLp_LysB (D), nsLp vazias (C). A figura 3.13 A representa o controlo negativo e a figura 3.13 B o controlo positivo por marcação do indução da activação com LPS de <i>E. coli</i> . ....	66

---

---

Figura 3.14 - Fotografias de microscópio óptico obtidas a diferentes ampliações. (A) Aspecto morfológico das culturas de macrófagos peritoneais após 1 e 8h de infecção com *M. smegmatis*. (B) Aspecto morfológico dos macrófagos peritoneais infectados por *M. smegmatis*, decorridas 1 e 8h desde o início do ensaio. Imagem obtida após contacto com as nsLp. (C) Aspecto morfológico dos macrófagos peritoneais infectados por *M. smegmatis*, decorridas 1 e 8h desde o início do ensaio. Imagem obtida após contacto com o sistema nsLp\_LysB. (D) Aspecto morfológico dos macrófagos peritoneais infectados por *M. smegmatis*, decorridas 1 e 8h desde o início do ensaio. Imagem obtida após contacto com a proteína livre (LysB). Para todas as culturas macrofágicas presentes no ensaio, excepto para o grupo controlo, promoveu-se, após a infecção, um contacto de 1h com os sistemas em estudo. .... 68

Figura 3.15 – Gráfico com a variação do valor de UFC de bactérias extraídas das células lisadas para cada intervalo de tempo em estudo. .... 72

Figura 3.16 – Gráfico com a variação do valor de UFC de bactérias extraídas de células lisadas para cada intervalo de tempo em estudo. .... 74

Figura 3.17 – Placa de TLC obtida após a eluição com o solvente (Clorofórmio:Metanol:Água). A) Controlo. Neste, os lípidos totais de *M. smegmatis* foram apenas tratados com PBS; B) representa análise dos lípidos totais de *M. smegmatis* após o tratamento dos mesmos com o sistema nsLp\_LysB, com as nsLp vazias e com a proteína LysB livre. .... 77

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1.1 – Fármacos com eficácia demonstrada para o <i>M. tuberculosis</i> . Adaptada de OMS, 2008 <sup>(102)</sup> .....	7
Tabela 2.1- Estirpes bacterianas utilizadas. ....	29
Tabela 2.2- Soluções utilizadas para a purificação da proteína LysB por cromatografia de afinidade. ....	31
Tabela 2.3 – Preparação de um gel para SDS-PAGE. ....	32
Tabela 2.4 – Preparação da curva de calibração com BSA.....	33
Tabela 2.5 – Parâmetros estabelecidos, de acordo com a literatura para a produção nsLp. ....	35
Tabela 3.1 – Eficiência de adsorção da LysB às nsLp, por incubação com uma concentração inicial de proteína de 1033,4. (A) Percentagem de lípido, (B) Diâmetro médio de nsLp_LysB, (C) Concentração de LysB no sobrenadante, (D) Eficiência de adsorção. ....	52
Tabela 3.2 – Diferentes condições em estudo. Cada amostra foi adicionada ao meio de cultura após inoculação. ....	57
Tabela 3.3 – Resultados do ensaio de citotoxicidade dos sistemas em estudo. ....	63

# Capítulo 1. Introdução

## 1.1. Tuberculose

A Tuberculose (TB), não sendo uma patologia recente, continua a representar uma das doenças infecciosas bacterianas mais importantes da actualidade <sup>(36, 81, 141)</sup>. Trata-se de uma infecção causada por uma bactéria, o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), também conhecido por bacilo de Koch, por ter sido identificado pela primeira vez por Robert Koch, em 1882 <sup>(34, 36, 141)</sup>. Só mais tarde, em 1907, Clemens von Pirquet, desenvolveu um teste laboratorial de diagnóstico da TB, o teste da tuberculina, importante para a sua detecção. Ainda no século XIX, os bacteriologistas Calmette e Guerin desenvolveram uma vacina preventiva, a *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) <sup>(34, 35, 122, 141)</sup>, cuja eficácia se resume à prevenção de infecções graves (meningite tuberculosa) <sup>(51, 141)</sup>. No entanto, foi apenas em 1944 com a descoberta da estreptomicina e em 1952 com a descoberta da isoniazida que o tratamento desta patologia foi possível <sup>(34, 61, 69)</sup>.

### 1.1.1. Epidemiologia

Numa perspectiva global, estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada pelo *M. tuberculosis* <sup>(44, 141)</sup>. Todos os anos surgem cerca de oito milhões de novos casos e, só em 2008, a TB vitimou 1,8 milhões de pessoas <sup>(30, 44, 86, 100, 142)</sup>. Os dados da

---

Organização Mundial de Saúde <sup>(89)</sup> indicam que, em 2008, surgiram 9,4 milhões de novos casos de TB <sup>(98, 100)</sup>.

A distribuição global da doença está intimamente relacionada com o nível socioeconómico das populações. As causas do agravamento da infecção têm sido atribuídas, em parte, ao aumento da pobreza, a situações de exclusão social como a toxicodependência, a fenómenos migratórios, ao incumprimento e desactivação de medidas de luta anti-tuberculosa. Contudo, a pandemia Vírus da Imunodeficiência Humana / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (VIH/SIDA) e a problemática relacionada com o desenvolvimento de estirpes resistentes aos antibacilares representam os factores centrais <sup>(8, 30, 60, 86, 101)</sup>.

### **1.1.2. Biologia e Infecção do *M. tuberculosis***

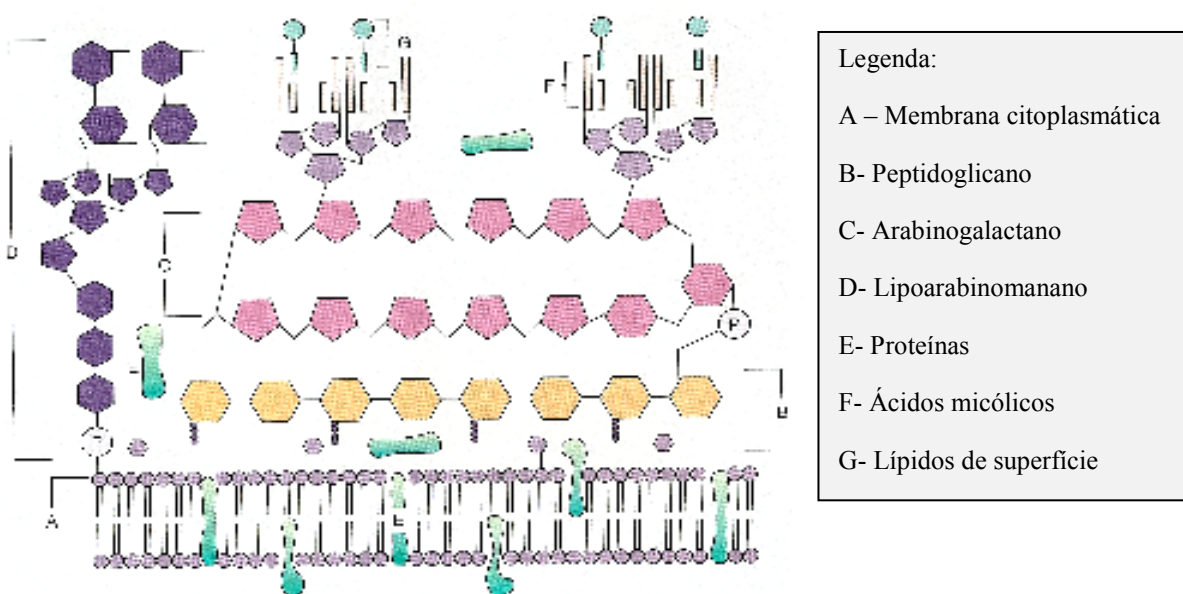
O *M. tuberculosis* pertence à ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*, família *Mycobacteriaceae*, que compreende apenas o género *Mycobacterium* <sup>(93)</sup>. Este caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-positiva e aeróbia estrita, que se divide lentamente em intervalos de 16 a 20 horas <sup>(41, 93)</sup>. A taxa de crescimento lento contribui, especificamente, para a promoção de mecanismos que minimizam a resposta imunitária inata e adaptativa do hospedeiro, mas é também importante para que o agente patogénico desenvolva mecanismos que lhe permitam permanecer num estado latente durante décadas <sup>(47, 93)</sup>.

Morfologicamente, o *M. tuberculosis* apresenta uma forma bacilar, não flagelada. Este agente patogénico não forma esporos, não apresenta cápsula e não produz toxinas, sendo a sua virulência resultado da sua capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos do hospedeiro <sup>(41, 93)</sup>.

As micobactérias, em particular o *M. tuberculosis* apresentam uma parede celular muito pouco permeável. Apesar de classificadas como Gram-positivas, as micobactérias

---

apresentam uma parede celular complexa, constituída por uma camada de peptidoglicano composta por unidades alternadas de N-acetilglucosamina e ácido N-glicolil-murâmico, situada logo a seguir à membrana citoplasmática. Ligado ao peptidoglicano, por ligações fosfodiéster, encontra-se o arabinogalactano cujas extremidades distais surgem esterificadas com os ácidos micólicos. Estes são ácidos gordos de cadeia muito longa, responsáveis pelas características próprias destas bactérias, como sejam a sua hidrofobicidade e resistência álcool-ácido. Desta forma, contribuem para a resistência natural destas bactérias aos agentes terapêuticos (Figura 1.1) (18, 66, 70, 93).



**Figura 1.1** – Estrutura da parede celular de uma micobactéria. Adaptado de Murray *et al*, 2005 (93).

### 1.1.3. Fisiopatologia

O *M. tuberculosis*, cresce preferencialmente em tecidos com elevada concentração de oxigénio, de que é exemplo o tecido pulmonar, dando origem a uma sintomatologia, inespecífica, que consiste em tosse intensa e persistente, febre, suores nocturnos, falta de apetite, emagrecimento e cansaço fácil. A infecção, embora apresente uma maior incidência

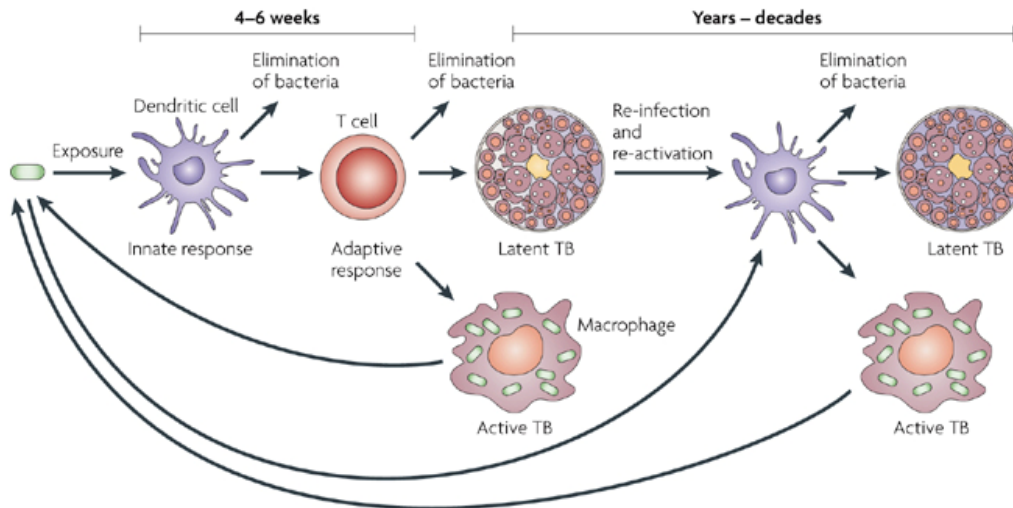
pulmonar, pode disseminar-se para o sangue e restantes órgãos do organismo, principalmente rins, medula óssea e cérebro<sup>(93)</sup>.

A principal via de transmissão da TB é respiratória, por contaminação com aerossóis expelidos no esforço da tosse, por um indivíduo infectado<sup>(37, 75, 135, 141)</sup>. Os aerossóis libertados para o meio ambiente contêm as partículas infecciosas que permanecem em suspensão, no ar circundante, por diversas horas<sup>(41, 75, 135)</sup>. Após inalação, o *M. tuberculosis* é fagocitado pelos macrófagos alveolares, iniciando-se uma cascata de funções antimicrobianas que podem resultar no controlo da infecção, seguido por uma TB latente ou, em 10% dos casos, na progressão para doença activa, designada por TB pulmonar<sup>(51)</sup>.

Independentemente do tipo de TB, activa ou latente, o desenvolvimento inicial envolve a produção de enzimas proteolíticas e citocinas pelos macrófagos com o objectivo de degradar o agente infeccioso<sup>(51)</sup>. As citocinas libertadas atraem os linfócitos T para o local conduzindo, deste modo, à formação de granulomas, lesões do tipo nodular, que criam um micro-ambiente capaz de limitar a replicação e a disseminação dos bacilos<sup>(51, 141)</sup>. Contudo, apesar da activação este ambiente destrói os macrófagos e conduz a uma necrose no centro da lesão. Em 2 a 3 semanas esta adquire um aspecto caseoso que é caracterizado por níveis reduzidos de oxigénio e pH, e também por um aporte nutritivo deficiente. Estas condições restringem o crescimento bacteriano e favorecem a progressão para o estado de latência. Em indivíduos imunocompetentes, estas lesões calcificam permitindo um eficaz controlo da infecção por manutenção dos bacilos num estado de dormência. No entanto, em situações em que o sistema imunitário se encontra debilitado, ocorre a formação do granuloma mas as defesas não permitem a contenção do bacilo no seu interior, fomentando a sua disseminação pelo sistema linfático e consequentemente a infecção de outros órgãos<sup>(51, 61, 135)</sup>.

---

Como referido anteriormente, a maior percentagem de infecções permanece em fase latente durante a vida do indivíduo, no entanto, em alguns casos a progressão para TB activa ocorre num curto espaço de tempo (Figura 1.2) <sup>(155)</sup>.



**Figura 1.2-** Evolução da infecção pelo *M. tuberculosis* ao longo do tempo. A maior percentagem de infecções permanece em fase latente durante toda a vida do indivíduo. Alguns doentes podem apresentar uma rápida progressão de TB latente para TB activa ou mesmo para TB com sintomas extra-pulmonares (5 a 10% do total de casos) Retirado de Young *et al.*, 2006 <sup>(155)</sup>.

A imunossupressão, a idade, a malnutrição, o uso de corticosteróides e a frequente co-infecção pelo VIH destacam-se como alguns dos factores que estão na origem de uma reactivação da patologia <sup>(51, 59, 141, 142)</sup>. O VIH não só aumenta a probabilidade de um indivíduo desenvolver a TB, como também diminui o intervalo de tempo livre entre a infecção latente e a doença activa <sup>(120, 126, 142)</sup>.

#### 1.1.4. Terapêutica

O principal objectivo terapêutico no tratamento da TB é a erradicação da carga bacilar no doente. Actualmente, a estratégia terapêutica consiste na combinação de potentes agentes

bactericidas, de forma a reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistências, comuns com a utilização de monoterapia <sup>(25, 69, 81, 102)</sup>.

Os fármacos habitualmente utilizados na terapêutica antibacilar classificam-se em dois grupos principais, os de primeira e os de segunda linha. De um modo geral, são antibióticos eficazes, mesmo nos estados mais avançados da doença. No entanto, é necessário administrar pelo menos dois fármacos com mecanismos de acção diferentes que, quando associados, permitam uma eliminação total do agente patogénico. O tratamento é promovido por períodos de tempo prolongados, uma vez que a eliminação de todas as bactérias é difícil e um menor intervalo de tempo poderia comprometer o sucesso da terapêutica <sup>(25, 81, 102)</sup>. Deste modo, esta deverá ter a duração mínima de seis meses, embora casos mais graves, como o da TB extrapulmonar, necessitem de um período terapêutico superior <sup>(25, 69, 102)</sup>.

A isoniazida, a rifampicina, a pirazinamida e o etambutol representam os antibióticos de primeira linha. Estes possuem uma actividade bactericida, combinam um elevado grau de eficácia com uma toxicidade relativamente baixa para o doente e têm como objectivo a eliminação dos bacilos metabolicamente activos. Os fármacos de segunda linha são apenas utilizados quando existe alguma contra-indicação para a utilização dos fármacos de primeira linha, como o aparecimento de resistências ao tratamento de primeira linha <sup>(25, 59, 102)</sup>. Os fármacos de segunda linha apresentam actividade bacteriostática, revelam uma menor eficácia terapêutica e uma toxicidade para o doente superior à apresentada pelos antibacilares de primeira linha (Tabela 1.1) <sup>(25, 102)</sup>.

**Tabela 1.1** – Fármacos com eficácia demonstrada para o *M. tuberculosis*. Adaptada de OMS, 2008

(102)

Antibacilares de 1ª linha	Antibacilares de 2ª linha			
	Injectáveis	Fluoroquinolonas	Orais bacteriostáticos	Com eficácia não comprovada para MDR-TB
Rifampicina	Canamicina	Levofloxacina	Etionamida	Clofazimina
Pirazinamida	Amicacina	Moxifloxacina	Protionamida	Linezolid
Etambutol	Capreomicina	Ofloxacina	Cicloserina	Amoxicilina + Ácido clavulânico
Rifabutina	Estreptomicina		Terizidona	Claritromicina
			Ácido $\rho$ -amino-salicílico	Imipenem
				Tioacetazona

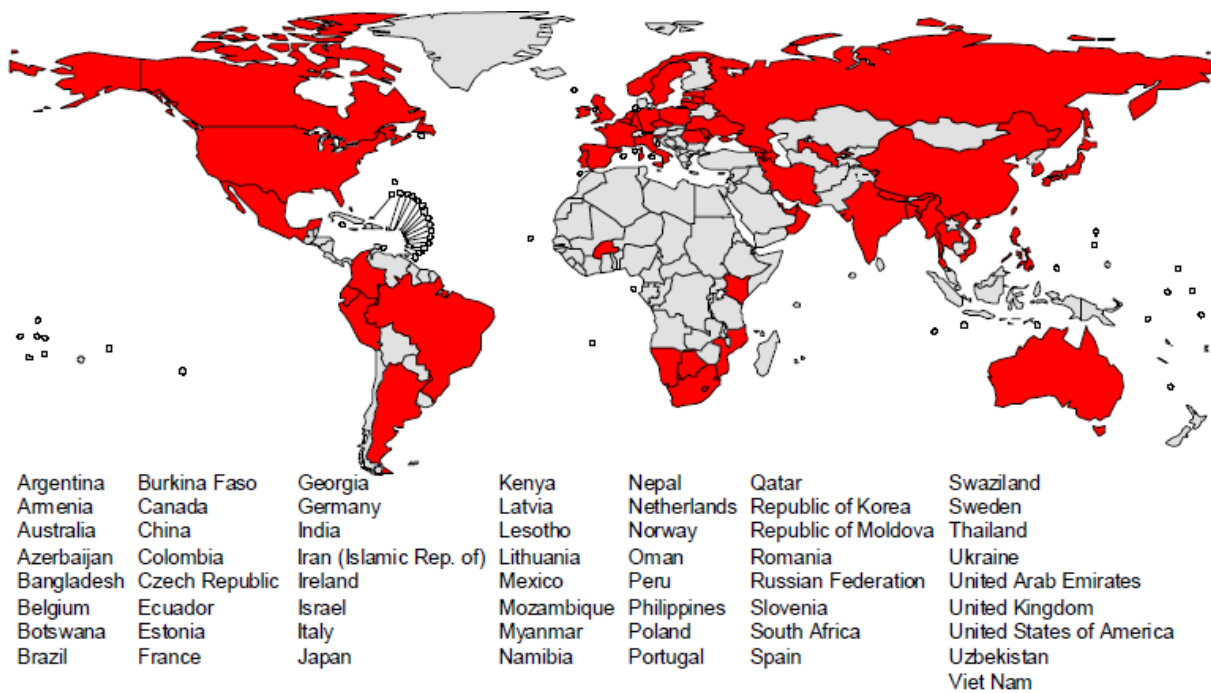
Uma terapêutica eficaz caracteriza-se por uma acção bactericida inicial, de forma a combater rápida e eficazmente os microrganismos em crescimento, com uma subsequente esterilização da população de bacilos na fase de latência, dividindo-se o tratamento em duas fases complementares e distintas<sup>(25, 102)</sup>. Os regimes terapêuticos apresentam uma fase inicial (2 meses) em que são administrados os quatro fármacos de primeira linha em simultâneo (isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida), e uma segunda fase com a duração de 4 meses, em que apenas se mantém o tratamento com a isoniazida e a rifampicina.

Na maioria dos casos, os fármacos são bem tolerados pelos doentes. Contudo, apresentam alguns efeitos adversos que, em conjunto com o elevado número de tomas diárias, dificultam a adesão à terapêutica por parte do doente e contribuem para o desenvolvimento de resistências<sup>(25, 71, 102, 142)</sup>. Esta é uma problemática quase tão antiga como a introdução no mercado dos primeiros fármacos antibacilares<sup>(29, 81)</sup>. A Tuberculose multirresistente (MDR-TB) é caracterizada pela presença de uma estirpe resistente aos dois fármacos de primeira

linha, essenciais e mais eficazes no tratamento da patologia, a rifampicina e a isoniazida <sup>(25, 29, 59, 81, 84, 129)</sup>. A MDR-TB é mais difícil de tratar, mais dispendiosa e apresenta uma maior mortalidade <sup>(25, 81, 142)</sup>. Estas situações particulares implicam a implementação de regimes terapêuticos diferentes, nos quais é importante proceder à substituição do fármaco para o qual foi observada uma resistência por um fármaco de segunda linha necessitando, na maioria dos casos, de períodos de tratamento superiores. Um regime terapêutico alternativo na presença de uma resistência à rifampicina poderá ser a administração de isoniazida, estreptomicina e pirazinamida, duas a três vezes por semana durante 7 meses <sup>(29, 84)</sup>.

Para além do incumprimento dos regimes terapêuticos, por não adesão do doente, outros factores como a implementação de regimes terapêuticos inadequados, a virulência do próprio agente patogénico, a existência de transportadores que podem estar na origem de uma resistência intrínseca ou adquirida aos diferentes fármacos, os factores genéticos do próprio hospedeiro e a co-infecção com o VIH, contribuem para o desenvolvimento de uma MDR-TB <sup>(25, 129)</sup>.

Recentemente, têm surgido estirpes com um padrão de resistência diferente do observado em casos de MDR-TB. O Center for disease control (CDC) designou esta nova apresentação de Tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB). A XDR-TB é caracterizada pela presença de uma infecção cujos isolados são resistentes à isoniazida e à rifampicina, a qualquer uma das fluoroquinolonas, e a pelo menos um dos fármacos injectáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) <sup>(1, 2, 68, 84)</sup>. Portugal é um dos 57 países em que esta forma de resistência já foi identificada, tal como indica a figura 1.3 <sup>(99)</sup>.



**Figura 1.3** – Representação esquemática onde estão representados os países que, até Setembro de 2009, reportaram pelo menos um caso de XDR-TB. Retirado de OMS <sup>(99)</sup>.

A problemática da resistência aos antibióticos não é exclusiva da TB. Muitos outros agentes bacterianos com resistências aos antibióticos têm sido alvo de uma grande preocupação em termos de Saúde Pública <sup>(67, 125)</sup>. Por esta razão, têm-se assistido à procura de novas alternativas terapêuticas eficazes e promissoras para o tratamento de infecções resistentes <sup>(62)</sup>. Assim, por um lado, têm-se assistido a um interesse crescente nos bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, e que podem no final do seu ciclo de replicação lisar a célula hospedeira <sup>(87)</sup>. Por outro lado, a procura de novas abordagens terapêuticas para fármacos ou moléculas activas existentes parece, também, ser uma solução auspiciosa. De facto, se for possível direccionar a terapêutica, diminuindo os efeitos adversos, o número de tomas diárias e o período de tratamento, as resistências poderão ser diminuídas e as terapêuticas tornar-se-ão mais seguras e eficazes.

## 1.2. Bacteriófagos

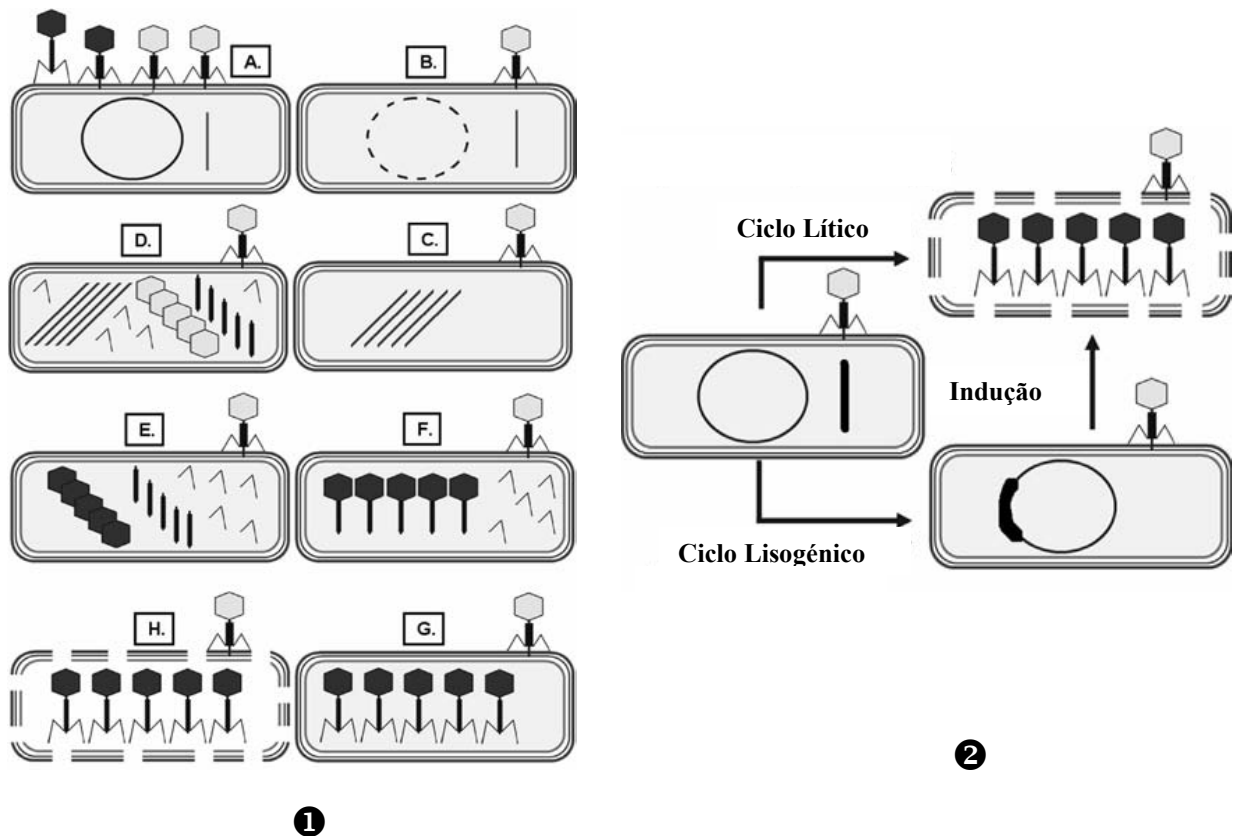
Os bacteriófagos são vírus que infectam células bacterianas, perturbando o seu metabolismo e promovendo, em alguns casos, a lise da célula. Estes representam uma das entidades mais abundantes no meio ambiente (existem cerca de  $10^{30}$  a  $10^{32}$ ) desempenhando um papel importante na regulação do equilíbrio microbiológico dos ecossistemas <sup>(21, 63, 110)</sup>. Foram inicialmente identificados, em 1915, por Frederick W. Twort e, em 1917, Félix d'Herelle, designou-os de bacteriófagos <sup>(7, 20, 42, 79, 134)</sup>. Estes são entidades que, necessitam do metabolismo e dos recursos energéticos e materiais das bactérias hospedeiras para a sua replicação. Os bacteriófagos são constituídos por um tipo de ácido nucleico, ácido desoxiribonucleico (ADN) ou ácido ribonucleico (8), de cadeia simples ou dupla (dsADN), protegido por uma cápside de natureza proteica ou lipoproteica. Na sua grande maioria podem ainda apresentar uma cauda, elemento importante para a sua classificação em famílias <sup>(21, 63)</sup>.

Os fagos estão classificados em famílias, de acordo com a natureza do seu genoma e as características morfológicas das suas partículas <sup>(21, 63, 87)</sup>. A maioria dos fagos descritos até à data são dsDNA, fagos com cauda que apresentam um ADN de cadeia dupla <sup>(63, 85, 87, 95)</sup>. Os bacteriófagos, quando no exterior da célula hospedeira, encontram-se sob a forma de partículas metabolicamente inertes, no entanto, aquando da infecção, têm a capacidade de redireccionar toda a maquinaria celular do hospedeiro para expressão dos seus próprios genes, replicação do seu genoma e síntese de novos viriões <sup>(63, 79, 87)</sup>.

Os bacteriófagos podem, de acordo com o seu ciclo de vida, ser classificados em virulentos ou temperados <sup>(63, 79, 87)</sup>. Os fagos temperados ou lisogénicos, ao contrário dos virulentos, que lisam a célula hospedeira, permanecem num estado latente, integrando o seu material genético no ADN cromossomal da bactéria (Figura 1.6) <sup>(63, 79, 87)</sup>. A indução do ciclo

---

lítico pode ocorrer de forma espontânea ou ser provocada por alterações das condições ambientais, por agentes químicos e antibióticos. A replicação de uma partícula fágica pode resumir-se em diferentes etapas. Inicialmente, ocorre a adsorção da partícula fágica aos receptores específicos na célula hospedeira. Seguidamente, o material genético do fago penetra na membrana celular e é injectado no interior da célula hospedeira. Após atingir o citoplasma, inicia-se uma fase de replicação do genoma fágico, com a produção dos diferentes componentes fágicos e posterior formação de novas partículas virais que, após a lise celular, são libertadas e infectam novas células (Figura 1.4) <sup>(63, 79)</sup>. No entanto, a lise só é possível após a produção de duas proteínas essenciais: uma endolisina, que ataca a parede celular e destrói uma das quatro ligações do peptidoglicano, e uma holina, que controla a lise e coopera com a endolisina para atingir o seu alvo <sup>(79, 82)</sup>.



**Figura 1.4** – ❶ Ciclo Lítico de um Bacteriófago. A. Adsorção do fago aos receptores da célula hospedeira e penetração do material genético; B. Degradação do genoma da célula hospedeira; C. Replicação do ADN fágico; D. Formação dos diferentes componentes das partículas fágicas; E. Introdução do ADN fágico na cápside; F. G. Formação das novas partículas fágicas; H. Lise da célula hospedeira e libertação dos fagos produzidos. ❷ Ciclo lítico e lisogénico de um bacteriófago. No ciclo lisogénico, o genoma fágico é integrado no genoma da célula hospedeira. Adaptado de Kropinski, 2006 <sup>(79)</sup>.

Com base na capacidade, inerente aos bacteriófagos, de lise da bactéria hospedeira, surge a terapia fágica. Este conceito não é recente e a sua primeira aplicação terapêutica, em humanos, ocorreu logo após a descoberta dos bacteriófagos <sup>(7, 42, 87, 134)</sup>. Na antiga União Soviética e Europa de Leste, este conceito foi frequentemente aplicado na prevenção e tratamento de infeções <sup>(7, 53, 63)</sup>. No entanto, a sua utilização foi abandonada, na década de 40,

em detrimento dos antibióticos e, principalmente, devido à sua falta de credibilidade e segurança <sup>(20, 53, 63, 87, 134)</sup>.

Actualmente, o crescente problema das infecções resistentes a antibióticos e o constante problema da inércia na investigação de novos antibióticos de sucesso tem motivado a investigação de novos bacteriófagos para aplicação clínica, bem como de proteínas estruturais dos fagos, renovando o interesse nestas terapêuticas alternativas <sup>(23, 28, 42, 63, 83, 134)</sup>. Existem estudos que descrevem também a utilidade de bacteriófagos como transportadores de antibióticos, direccionando a terapêutica às células ou tecidos-alvo a que se destinam <sup>(11, 28, 151, 153)</sup>.

### **1.2.1. Micobacteriófagos**

Os micobacteriófagos são bacteriófagos que apresentam a capacidade de infectar micobactérias e foram pela primeira vez isolados há mais de 60 anos <sup>(64, 110, 124)</sup>. A sua utilidade para o diagnóstico de infecções micobacterianas, como a TB, e para o desenvolvimento de ferramentas genéticas importantes no estudo das micobactérias tem sido demonstrada por alguns investigadores <sup>(6, 64, 110, 112, 115)</sup>.

As cassetes líticas de bacteriófagos que infectam micobactérias contêm, como todos os bacteriófagos de dsADN, uma endolisina e uma holina <sup>(54, 58, 82, 156)</sup>.

O micobacteriófago Ms6 é um fago temperado, de dsADN, que pertence à família *Siphoviridae* e que apresenta a capacidade de infectar *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) <sup>(54, 58, 117)</sup>. A cassette lítica do fago Ms6 é constituída por 5 genes. Tal como todos os fagos de dsDNA, este contêm os dois genes essenciais para a lise da célula hospedeira: o gene *lysA* (*gp2*) que codifica para uma endolisina e o gene *hol* (*gp4*) que codifica para uma holina. Entre estes dois genes, situa-se o gene *lysB* que codifica para uma proteína com

---

actividade lipolítica<sup>(54, 57, 58)</sup>. Os trabalhos realizados com base neste princípio por Gil (2008) revelaram que a adição desta proteína a uma cultura de *M. smegmatis* resulta, em determinadas condições, na inibição do crescimento bacteriano<sup>(57)</sup>. Por outro lado, pela análise dos diferentes componentes lipídicos constituintes da parede celular micobacteriana o investigador concluiu também que o tratamento das células de *M. smegmatis* com LysB conduzia a uma alteração na fracção lipídica apolar<sup>(57, 58)</sup>. Desta forma e tendo em vista a complexidade da parede das micobactérias, pensa-se que a proteína LysB, e proteínas homólogas, desempenham um papel importante na lise das micobactérias<sup>(57, 58, 65)</sup>.

A utilização de proteínas fágicas capazes de degradar a parede das células bacterianas tem sido avaliada, com o objectivo de uma possível aplicação terapêutica. No entanto, uma das questões que tem sido discutida prende-se com a estabilidade destas proteínas “in vivo”, ou seja, de que forma deverá ser feita a sua administração para que atinjam o seu local de acção.

A aplicação de nanopartículas como transportadores submicrométricos parece ser a chave para a aplicação de uma terapêutica direccionada de proteínas e péptidos<sup>(13)</sup>. Na sua maioria, consideram-nas como veículos eficazes para o transporte de fármacos directamente ao local de acção. No que respeita à TB têm sido exaustivamente estudadas para a administração terapêutica de fármacos por via inalatória.

### **1.3. Nanomedicina**

A nanomedicina é um conceito que abrange diferentes áreas científicas, como a nanotecnologia e a nanotoxicologia. A estas associa-se a investigação e desenvolvimento de nanoestruturas orgânicas ou inorgânicas, bem como o estudo das suas interacções com os organismos vivos<sup>(45, 91)</sup>. O conceito de “*drug delivery systems*” ou sistemas de veiculação de

---

fármacos constitui uma área transversal a este universo, que tem sido intensamente explorada pela comunidade científica<sup>(12, 13, 52, 89, 91, 109, 114)</sup>. Com a aplicação de sistemas de veiculação à prática clínica pretende-se o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, nas quais estes sistemas representam potenciais transportadores de moléculas activas a tecidos-alvo, que podem ser organelos muito específicos ou células individualizadas<sup>(13, 52, 109, 114)</sup>. Os sistemas de partículas coloidais, entre os quais se destacam as nanopartículas poliméricas, os sistemas micelares poliméricos, nanopartículas lipídicas e sistemas lipossomais, encontram na nanomedicina uma diversidade de aplicações, nas quais é possível incluir, o transporte selectivo de fármacos, a terapêutica imunológica, a imageologia e o diagnóstico<sup>(3, 9, 12, 19, 74, 76, 89, 91, 114, 133, 136, 157)</sup>.

Em infecciologia, a aplicabilidade destas ferramentas à escala nanométrica, traduz-se no desenvolvimento de sistemas coloidais para o transporte de agentes terapêuticos. Estes têm sido estudados para o tratamento experimental de diferentes patologias infecciosas, incluindo a TB<sup>(10, 14, 19, 40, 55, 109)</sup>.

### **1.3.1. Sistemas de veiculação de fármacos**

A noção de transportador, em nanotecnologia, compreende o desenvolvimento de dispersões de partículas submicrométricas, que apresentam a capacidade de incorporar agentes terapêuticos ou imageológicos<sup>(13, 39, 89, 109, 136)</sup>. Apesar do interesse crescente nos sistemas de veiculação de fármacos para fins terapêuticos e de diagnóstico imageológico, actualmente, existem ainda poucos sistemas com aprovação para uso clínico<sup>(19, 113)</sup>. A mais-valia terapêutica destes sistemas de partículas está relacionada com a sua capacidade para incorporação de fármacos, administração e distribuição ao alvo terapêutico<sup>(19, 32, 55, 91, 97, 114)</sup>. O tipo de interacção com os sistemas biológicos é uma característica importante para o

---

sucesso de um sistema de partículas, não só devido à natureza do material base, mas também devido à carga de superfície e dimensão da entidade dispersa, que influenciam o seu comportamento “*in vivo*”, ou seja, a sua retenção, absorção, metabolização e eliminação <sup>(13, 32, 114, 118)</sup>.

A natureza das matérias-primas de suporte constitui um aspecto essencial no que se refere à capacidade de, após administração, direccionar o fármaco a alvos específicos. A gama de materiais disponíveis para desenhar matrizes biocompatíveis, susceptíveis de serem utilizadas em tecnologia farmacêutica é vasta. De facto, a estrutura destas partículas reflecte as suas capacidades em ultrapassar as membranas biológicas e condiciona as vias de administração possíveis. Os materiais de natureza lipídica parecem vantajosos por serem constituintes naturais dos organismos vivos, nos quais se apresentam sob diferentes formas e, por essa razão, desempenham funções diversas <sup>(4, 27, 48, 91, 113, 114, 143)</sup>.

O desenvolvimento de sistemas selectivos tem como objectivo a veiculação de moléculas ou fármacos, usufruindo das vantagens do transportador. Se, por um lado, o transportador constitui uma barreira física e química protegendo a molécula, no seu interior ou a ele ligado, da degradação enzimática própria dos mecanismos fisiológicos. Por outro, permite direccionar moléculas a um órgão alvo, restringindo a este a sua actividade farmacológica e limitando a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos associados, na maior parte dos casos, à administração da forma livre <sup>(9, 19, 41, 114, 136)</sup>. Deste modo, a aplicação de sistemas coloidais à prática clínica permite direccionar o fármaco directamente ao seu local de acção e alterar a sua farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade. Assim, é possível aumentar a efectividade terapêutica, alterando o índice terapêutico da forma livre, sem que isso implique um aumento da toxicidade dos fármacos administrados <sup>(9, 19, 114, 133)</sup>.

---

Os lípidos, nomeadamente os triacilgliceróis, têm, ultimamente, suscitado uma atenção crescente dos meios científicos, sobretudo devido à sua capacidade única em atingir compartimentos biológicos<sup>(96, 149)</sup>. De facto, transportadores de natureza lipídica tais como, os lipossomas<sup>(19, 73, 97, 138, 147, 148)</sup>, as micropartículas<sup>(43, 94, 128, 133, 158)</sup>, as SLN<sup>(19, 39, 55, 107, 113)</sup> e as nsLp<sup>(144)</sup> são, actualmente, objecto de investigação científica, para fazer face a desafios em áreas diversas da nanomedicina<sup>(13, 26, 38, 55, 77, 152)</sup>.

O desenvolvimento de dispersões de lípidos sólidos, embora recente, causou uma grande expectativa ao nível da nanotecnologia, sobretudo pela sua adequabilidade aos compostos bioterapêuticos<sup>(149)</sup>. De um modo geral, uma dispersão lipídica resulta da homogeneização de duas fases imiscíveis, uma constituída por um ou mais lípidos previamente fundidos ou dissolvidos em solvente apropriado, e outra constituída por uma solução aquosa de tensoactivo. Este procedimento permite obter sistemas de partículas sob a forma de SLN, NLC e nsLp<sup>(19, 55, 107, 113, 144, 152)</sup>. A biocompatibilidade destes sistemas lipídicos e a facilidade com que trespassam as barreiras celulares, incluindo o epitélio bronco-alveolar, estão intimamente relacionadas com o diâmetro submicrométrico, e com os seus constituintes maioritários, partículas, água, lipídeo e tensoactivo<sup>(55, 90)</sup>. Os lípidos (mono, di e triglicéridos ou ceras) utilizados para o desenvolvimento destes sistemas, dada a sua lipofilia, constituem sistemas adequados sobretudo ao transporte de macromoléculas lipofílicas ou substâncias activas fracamente hidrosolúveis<sup>(55, 72)</sup>. As nsLp, como sistemas lipídicos para veiculação de fármacos, são constituídas por excipientes farmacêuticos, vulgarmente utilizados na tecnologia de formas sólidas e semi-sólidas.

### 1.3.2. nsLp

Os sistemas dispersos para veiculação de fármacos são constituídos por partículas lipídicas, tais como as SLN, as NLC ou as nsLp, e podem ser definidos como suspensões nanométricas, organizados aparentemente como uma estrutura compacta, que apresenta a capacidade de aprisionar moléculas no reticulado da matriz formada <sup>(92, 152)</sup>. Estes, ao contrário dos lipossomas, apresentam uma maior estabilidade e eficiência de incorporação de fármacos, e são considerados sistemas seguros, que não apresentam o risco associado à utilização de solventes orgânicos, presentes em alguns sistemas poliméricos <sup>(19, 107)</sup>. O custo de produção é também um factor importante, e as nanopartículas lipídicas apresentam como vantagem um custo inferior ao de outros sistemas transportadores <sup>(107)</sup>.

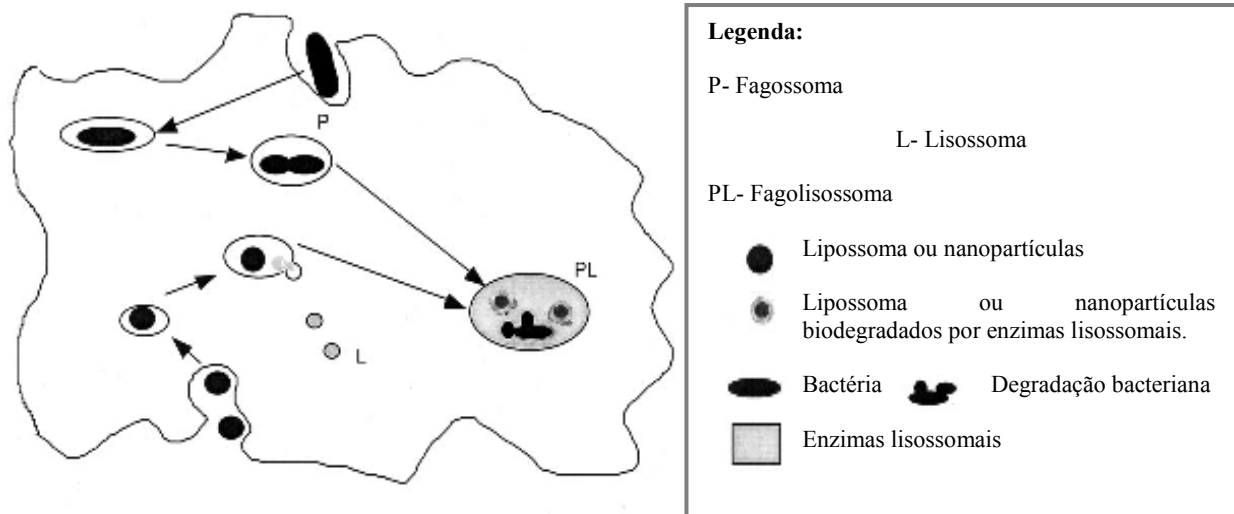
O método de produção de sistemas dispersos de nanopartículas lipídicas representa, um factor influente para as características do produto final. A preparação de nanopartículas a partir de lípidos sólidos exige a fusão do lípido que a constitui, como tal, o controlo da temperatura de fusão é um dos parâmetros a monitorizar. As propriedades das nanopartículas lipídicas preparadas através de um método de emulsificação/solidificação resultam da relação entre a força de agitação e a dispersão obtida, dispensando este método de condições extremas de pressão e de concentração de tensioactivo <sup>(144)</sup>.

As dispersões de nanopartículas lipídicas apresentam as vantagens inerentes aos dois estados da matéria, sólido e líquido <sup>(149)</sup>. De facto, esta estrutura contribui não só para a eficácia das nanopartículas lipídicas no que respeita à retenção do fármaco no seu interior, mas também para o seu desempenho como transportador “*in vivo*”, que apresenta uma capacidade própria para a transposição de barreiras biológicas <sup>(144, 146)</sup>.

#### 1.4. Macrófagos alveolares como alvo de terapêuticas intracelulares

O desenvolvimento de terapêuticas intracelulares não é uma necessidade recente <sup>(19, 27)</sup>. O desafio consiste em desenhar e formular transportadores que apresentem afinidade para as células fagocíticas <sup>(19)</sup>. Os lipossomas e as nanopartículas são dois tipos de transportadores desenvolvidos para este tipo de estratégias. A natureza coloidal, biodegradável e similar aos parasitas intracelulares favorece a interação destas partículas submicrométricas com os organitos celulares, permitindo a sua utilização em patologias como a TB, principalmente, devido à sua especificidade para células fagocitárias como os macrófagos alveolares <sup>(9, 55, 97, 113)</sup>.

As infecções bacterianas intracelulares são particularmente difíceis de erradicar, uma vez que os microrganismos por elas responsáveis lutam pela sua sobrevivência utilizando mecanismos de defesa sofisticados como a inibição da fusão do fagolisossoma, a resistência à acção das enzimas lisossomais e a produção de radicais de oxigénio importantes na defesa contra os macrófagos do hospedeiro <sup>(4, 88, 113)</sup>. Apesar do desenvolvimento e comercialização de novos antibióticos potentes, o tratamento destas infecções revela-se ineficaz, não permitindo a eliminação total do agente patogénico <sup>(97, 113)</sup>. Com a adsorção e encapsulação de novas moléculas activas ou de antibióticos já existentes em transportadores coloidais como, os lipossomas e as nanopartículas, pretende-se uma distribuição exclusiva às células infectadas, melhorando a sua eficácia terapêutica (Figura 1.5) <sup>(55, 97, 113)</sup>.



**Figura 1.5** – Mecanismo de ação de transportadores submicrométricos, lipossomas e nanopartículas, com moléculas activas encapsuladas sobre o seu alvo específico, agentes patogênicos intracelulares. Adaptado de Pinto-Alphandary *et al*, 2000 <sup>(113)</sup>.

### 1.5. Administração Pulmonar

O tracto respiratório superior está fundamentalmente ligado à filtração, humidificação e ajuste da temperatura do ar inspirado. Pelo contrário, as vias aéreas inferiores estão envolvidas na dinâmica funcional das trocas gasosas, que se processam entre as unidades respiratórias periféricas, os alvéolos, e os capilares pulmonares. Assim podemos distinguir duas regiões em termos de funcionalidade, as vias aéreas de condução (VACs) e o pulmão profundo. A remoção de partículas, orgânicas, biológicas e inorgânicas, depositadas no espaço pulmonar é função do diâmetro das mesmas e envolve diversos processos, como a dissolução nos fluidos pulmonar ou intersticial, a fagocitose pelos macrófagos alveolares ou a difusão ou passagem pelo epitélio brônquico e alveolar <sup>(16)</sup>. Assim, consideram-se dois fenómenos fundamentais na absorção de partículas coloidais que atingem a região alveolar: a fagocitose pelos macrófagos alveolares ou a passagem ao interstício pulmonar.

No que diz respeito às doenças pulmonares, uma maior eficácia terapêutica só será encontrada através do balanço entre os novos sistemas terapêuticos e as vias de administração alternativas. Esta abordagem, paralelamente à incorporação de fármacos em matrizes coloidais, deve permitir controlar de forma selectiva a acção terapêutica e trazer benefícios em relação às terapêuticas convencionais administradas por via endovenosa e oral <sup>(9, 80, 103, 131)</sup>.

Convencionalmente, a administração pulmonar é utilizada essencialmente em patologias das vias respiratórias como a asma e fibrose cística <sup>(50, 80)</sup>. Contudo, a nebulização de fármacos com a finalidade de obter um efeito sistémico representa um conceito que tem evoluído ao longo dos anos para a aplicação de alguns fármacos específicos como anestésicos, analgésicos, hormonas (insulina, calcitonina, factor de crescimento), heparina <sup>(32, 50, 80, 119, 121, 131)</sup>. Esta via de administração particular apresenta a vantagem de evitar o efeito de primeira passagem hepática, o que permite reduzir a dose administrada uma vez que o fármaco inalado pode ser absorvido na sua totalidade em consequência da superfície epitelial pulmonar <sup>(55, 80, 103, 114, 119, 136)</sup>. Uma outra característica relevante na administração pulmonar relaciona-se com a actividade enzimática, que apresenta níveis muito inferiores aos encontrados no tracto gastrointestinal, tornando possível a administração pulmonar de biomoléculas ou moléculas sensíveis como, péptidos, proteínas e ADN <sup>(32, 80, 114, 119)</sup>. Desta forma, são atribuídas inúmeras vantagens às formas farmacêuticas para inalação, e aos aerossóis em particular. Estas formulações apresentam uma área de superfície elevada relativamente à entidade dispersa, o que em conjunto com as características estruturais do pulmão, nomeadamente a área respirável disponível, torna-as um sistema terapêutico de eleição. Estas formas farmacêuticas podem ser utilizadas para o tratamento de doenças pulmonares e/ou outras patologias com envolvimento sistémico, desde que, sejam ultrapassadas as barreiras pulmonares: surfactante pulmonar, o fluido de superfície, os epitélios e membrana basal e o espaço intersticial e tendo

---

em conta as características de vascularização do próprio órgão<sup>(80, 121)</sup>. A inalação de um fármaco gera uma acção terapêutica local rápida, mesmo por administração de doses inferiores às que seriam necessárias no caso da administração intravenosa ou pelo tracto gastrointestinal<sup>(80, 114, 121)</sup>. A possibilidade de reduzir a concentração necessária para obter efeito farmacológico, oferece ainda a vantagem de ser possível controlar a concentração de fármaco inalado, de modo a atingir concentrações sistémicas baixas, reduzindo a probabilidade de desenvolvimento de efeitos laterais<sup>(9, 114)</sup>.

As características das nanopartículas lipídicas como a cristalinidade da matriz, o *dm* e a distribuição granulométrica das dispersões são parâmetros importantes a ter em consideração aquando da selecção de um sistema de veiculação de fármacos para administração pulmonar<sup>(144)</sup>.

### **1.5.1. O pulmão como via de administração de sistemas coloidais para o tratamento da TB**

O desenvolvimento de transportadores coloidais, capazes de conduzir selectivamente agentes terapêuticos, utilizando vias de administração convencionais, tem sido exhaustivamente investigado com o objectivo de diminuir ou suprimir os efeitos colaterais e aumentar a sua eficácia terapêutica<sup>(31, 55, 103, 136, 157)</sup>. Neste contexto, torna-se extraordinariamente importante uma vantagem atribuível às nanopartículas lipídicas, a possibilidade de serem administradas por diferentes vias, entre quais a pulmonar, a intravenosa, a intranasal, a oral, a ocular, e a transdérmica<sup>(9, 55, 118, 136, 145, 146)</sup>.

De facto, relativamente à incorporação de agentes antibacilares, numerosos sistemas de nanopartículas têm sido propostos<sup>(9, 157)</sup>. De um modo geral, o insucesso das terapêuticas antibacilares está relacionado com a não adesão do doente, resultante, em parte, do elevado

---

número de tomas diárias, durante períodos de tempo prolongados <sup>(9, 103, 157, 158)</sup>. As nanopartículas, os lipossomas e as micropartículas formulados como sistemas transportadores são rapidamente capturados pelas células fagocíticas e, em especial, pelas células de Kupffer no fígado, permitindo, deste modo, o seu acesso a qualquer outro órgão do organismo, incluindo o pulmão. A crescente incidência da TB pulmonar exige o desenvolvimento de alternativas terapêuticas eficazes. Deste modo, a aplicação de sistemas transportadores que aumentem a biodisponibilidade e a biodistribuição de fármacos no principal alvo de acção, o pulmão, é urgente <sup>(103, 157, 158)</sup>. Zahoor *et al* (2005) concluiu que a administração por meio de aerossóis de nanopartículas contendo fármacos antibacilares encapsulados aumenta a sua biodistribuição no órgão alvo, e também em diferentes partes do organismo. Com este estudo observou ainda uma retenção dos fármacos administrados, em diferentes tecidos, por um período de quinze dias <sup>(157)</sup>. De um modo geral, as vantagens da utilização de sistemas transportadores de terapêuticas antibacilares relacionam-se com a possibilidade de libertação dos fármacos de forma controlada, prevenção da degradação prematura das moléculas activas e também redução da sua toxicidade <sup>(9, 157)</sup>.

Pandey *et al* (2004) desenvolveram um estudo experimental com o objectivo de avaliar a biodistribuição de fármacos antibacilares, isoniazida e rifampicina, encapsulados em transportadores lipossomais em modelo animal após administração pulmonar por nebulização. Com o estudo concluíram que, com apenas uma administração, os níveis terapêuticos eram mantidos durante um período de tempo (cerca de 48h) superior, quando comparados com a administração do fármaco na sua forma livre, o que significa que é possível reduzir a frequência de administração sem alterar a eficácia terapêutica <sup>(106)</sup>. Neste contexto, a administração pulmonar emerge como uma opção à via sistémica. A administração pulmonar, apresenta vantagens significativas, relacionadas com as suas propriedades estruturais,

---

funcionais e bioquímicas, estando uma das características mais importantes relacionada com o facto de esta barreira biológica, em contacto com o exterior, corresponder a uma elevada superfície de absorção ao nível do epitélio e do espaço intersticial<sup>(9, 80, 103, 119)</sup>.

Um dos principais motivos de eleição da terapêutica inalatória para a administração pulmonar de sistemas transportadores submicrométricos de fármacos antibacilares, prende-se com o facto de, não sendo uma técnica invasiva, esta permitir uma maior adesão à terapêutica, por parte do doente<sup>(55)</sup>. Assim, a inalação poderá constituir a via de eleição alternativa aos métodos convencionais de tratamento da TB, adequada inclusive ao tratamento em ambulatório.

Os sistemas transportadores assumem uma enorme importância na área dos novos sistemas terapêuticos, sobretudo quando há necessidade de direccionar o fármaco, tanto quanto possível, para uma região específica de um órgão ou tecido, preservando a sua actividade e tornando-o disponível em dose terapêutica<sup>(12, 103)</sup>. As nanopartículas têm sido estudadas como veículos transportadores de fármacos, passíveis se serem aplicados em doenças com características bem distintas, entre as quais a TB<sup>(55, 103, 136)</sup>.

Sharma *et al* (2004) desenvolveram um estudo, no qual, compararam a eficácia de um sistema de nanopartículas, com fármacos antibacilares incorporados, após administração por via inalatória, com a eficácia dos mesmos na sua forma oral convencional. Estes concluíram que o sistema transportador por eles criado permitia uma libertação do fármaco no seu local de acção, de forma controlada, obtendo-se uma contagem de UFC (Unidades formadoras de colónias) indetectável após a administração de três dosagens com intervalo de 15 dias entre cada aplicação. Por outro lado, com a administração oral, o mesmo efeito terapêutico só seria visível após 45 dias de tratamento consecutivos. Verificaram ainda que, ao contrário do fármaco livre, não parecia existir nenhum sinal de hepatotoxicidade após a administração

---

pulmonar deste sistema de partículas <sup>(127)</sup>. Este estudo vem reforçar a aplicação das nanopartículas como transportadores de fármacos/moléculas activas no tratamento desta patologia específica, uma vez que, através dele é possível reduzir os efeitos adversos e a dose terapêutica, aumentando a eficácia do tratamento. Também Pandey *et al* (2003) desenvolveram um sistema de nanopartículas, no qual incorporaram três fármacos antibacilares, a isoniazida, a pirazinamida e a rifampicina, com o objectivo principal de formular um sistema terapêutico, para administração pulmonar, capaz de reduzir a frequência posológica diária, característica dos regimes utilizados para a TB, aumentando a adesão do doente à terapêutica. Assim, concluíram que com a aplicação de um sistema de nanopartículas para veiculação de fármacos é possível reduzir não só a dose mas também frequência posológica, mantendo o mesmo efeito terapêutico <sup>(104)</sup>. Os autores referem ainda que, mesmo com administrações sucessivas do composto terapêutico, não se observa hepatotoxicidade, sendo a ocorrência de efeitos adversos menor, comparativamente à administração do fármaco na sua forma livre <sup>(104)</sup>. Este estudo, quando comparado a um outro estudo dos mesmos investigadores permite também a comparação entre a via de administração pulmonar com a oral e subcutânea, concluindo-se que a eficácia terapêutica é superior após a administração pulmonar, uma vez que, ao contrário da via oral e subcutânea, esta permite uma redução da carga bacilar a níveis indetectáveis <sup>(104, 108)</sup>.

Uma outra questão importante relaciona-se com a administração de proteínas e péptidos por via inalatória, até à data considerada controversa e de difícil realização. A administração pulmonar permite uma rápida absorção da molécula activa. Contudo, este factor nem sempre representa uma vantagem, uma vez que uma curta duração do efeito terapêutico pode significar a necessidade diária de múltiplas doses. Por outro lado a administração pulmonar de tais moléculas promove, na maioria dos casos, a ocorrência de

---

reações antigénicas por parte de algumas linhagens celulares localizadas no pulmão. Mais ainda, a instabilidade destas preparações, é também uma contra-indicação, uma vez que a via de administração pode reduzir a sua actividade biológica. A utilização de transportadores coloidais para a administração de proteínas e péptidos parece ser a solução. A encapsulação/adsorção de proteínas às nanopartículas aumenta a duração do seu efeito terapêutico, uma vez que promove a libertação controlada das mesmas. Por outro lado, estes sistemas ao protegerem as moléculas no seu interior reduzem a possibilidade de ocorrerem respostas imunogénicas após a inalação, mantendo a sua estabilidade <sup>(130)</sup>.

Estudos anteriores concluíram que a adição da proteína LysB a uma cultura de *M. smegmatis* pode, em determinadas condições, inibir o crescimento bacteriano da cultura <sup>(58)</sup>. Deste modo será interessante observar o efeito desta mesma proteína em estirpes virulentas de *M. tuberculosis*. Contudo, e apesar de representar uma estratégia promissora, a sua aplicação clínica encontra-se comprometida, uma vez que a administração de proteínas por via inalatória para o tratamento de doenças respiratórias se tem observado ineficaz <sup>(130)</sup>.

O *M. tuberculosis* é, tal como referido anteriormente, uma bactéria de crescimento lento. Deste modo, os regimes ou estratégias terapêuticas devem, idealmente, apresentar para períodos de administração prolongados, baixos níveis de toxicidade e, ser bactericidas, eliminando rapidamente o microrganismo. Por outro lado, e sendo o *mycobacterium* um parasita intracelular, os fármacos devem ser capazes de ser internalizados pelas células hospedeiras. Assim o método ideal para o tratamento da TB seria aquele que promoveria a distribuição do composto de forma segura e por períodos de tempo prolongados, promovendo também o seu transporte ao ambiente intracelular no qual permanecem em estado latente inúmeros bacilos <sup>(118)</sup>.

---

O desenvolvimento de um sistema transportador de LysB com a capacidade de direccionar esta proteína ao seu local de acção poderá contribuir para o “desenho” de novas estratégias eficazes no tratamento da TB.

## 1.6. Objectivos

Várias abordagens têm sido propostas para o tratamento das micobactérias, incluindo as multirresistentes. Entre elas, diminuir a ausência de selectividade dos fármacos existentes tornando-os farmacologicamente mais eficazes.

O objectivo deste trabalho consiste em, numa primeira fase desenvolver um sistema de nanopartículas lipídicas que apresentem a capacidade de adsorver a proteína LysB do micobacteriófago Ms6. Seguidamente pretende-se o desenvolvimento de um sistema terapêutico, no qual a proteína LysB se encontra adsorvida eficazmente às nsLp.

Numa segunda fase pretende-se perceber qual o efeito da adição do sistema nsLp\_LysB desenvolvido, sobre o crescimento *Mycobacterium smegmatis* em cultura. Adicionalmente, e com o objectivo de avaliar a possível endocitose do sistema nsLp\_LysB pretende-se analisar o efeito do mesmo em culturas de macrófagos infectados com as micobactérias seleccionadas para o estudo.

É ainda objectivo do presente trabalho a comparação da eficácia terapêutica do sistema nsLp\_LysB, com actividade antimicrobiana da forma livre (LysB).

## Capítulo 2. Material e Métodos

### 2.1. Estirpes Bacterianas e Bacteriófagos

As diferentes estirpes bacterianas utilizadas na realização deste trabalho encontram-se identificadas na tabela 2.1.

**Tabela 2.1-** Estirpes bacterianas utilizadas.

Estirpe bacteriana	Descrição	Referência ou Fonte
<i>M. smegmatis</i> (mc <sup>2</sup> 155)	Mutante de <i>M. smegmatis</i> ATCC607 com alta eficiência de transformação	Snapper <i>et al</i> <sup>(132)</sup>
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG ( <i>M. bovis</i> )	Estirpe da vacina 1173P2	Estirpe Pasteur ATCC 35734
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Estirpe de <i>M. tuberculosis</i> avirulento	ATCC 25177
<i>Escherichia coli</i> JM109 ( <i>E. coli</i> )	Estirpe de <i>E. coli</i> JM109 contendo o plasmídeo pM302	Gil <i>et al</i> <sup>(58)</sup>

### **2. 1.1. Condições de crescimento**

As estirpes de micobactérias foram cultivadas num meio sintético de 7H9 suplementado com 0,05% de Tween 80<sup>®</sup> ou com 0,05% de Brij 35, com agitação a 37°C. O meio 7H10 foi o utilizado para o crescimento em meio sólido com uma temperatura de incubação de 37°C. A estirpe recombinante de *E. coli* JM109 contendo o plasmídeo pM302<sup>(58)</sup> foi cultivada a 37°C em meio líquido *Luria-Bertani broth* (LB) (Difco, Detroit, EUA), com agitação ou em meio LB agar suplementado com 100 µg/ml de ampicilina.

Todos os procedimentos envolvendo as estirpes de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG, foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical num laboratório de nível de segurança biológica 3, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e, de acordo com as respectivas normas de segurança.

## **2. 2. Produção da proteína LysB**

### **2. 2.1. Expressão e Purificação de LysB em *E. coli***

Obteve-se a proteína LysB purificada a partir da indução da sua expressão em *E. coli* (pMP302). As células foram cultivadas até que se atingisse a densidade óptica de 600nm (DO<sub>600</sub>). Nesta altura, a expressão foi induzida pela adição de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Novabiochem) de modo a obter uma concentração final de 1mM, durante 4h. As células foram depois centrifugadas a 4000rpm durante 15min e o sedimento celular lavado por duas vezes com Tampão Fosfato (PBS). O sedimento foi ressuspensionado em 20ml do mesmo tampão, suplementado com uma mistura de inibidores de

---

proteases (500 $\mu$ M AEBSF, 500 $\mu$ M EDTA, 1 $\mu$ M E-64, 1 $\mu$ M Leupeptina, 150nM Aprotinina; Calbiochem).

No passo seguinte, promoveu-se a lise celular, para extracção das fracções proteicas, em prensa de *French* (*French Pressure Cell Pressure* – Thermo Electron), a uma pressão de 15.000 lb/in<sup>2</sup>, três vezes consecutivas. Em seguida procedeu-se à centrifugação a 10.000 rpm durante 15min a 4°C, do lisado celular obtido.

Utilizando como técnica a cromatografia de afinidade, purificou-se o sobrenadante, correspondente à fracção solúvel. Para este efeito utilizou-se uma coluna (Sigma) com resina Ni-NTA (Qiagen) carregada de iões Ni<sup>2+</sup> e os tampões descritos na tabela 2.2, de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela 2.2-** Soluções utilizadas para a purificação da proteína LysB por cromatografia de afinidade.

Tampão	Composição
<b>Tampão de equilíbrio/lavagem</b>	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300mM NaCl 10mM Imidazole pH 7,5
<b>Tampão de Eluição I</b>	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300mM NaCl 30mM Imidazole pH 7,5
<b>Tampão de Eluição II</b>	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300mM NaCl 250mM Imidazole pH 7,5

Recolheram-se 15 fracções de 1,5 ml cada, que foram analisadas por electroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE), seguido da coloração do gel com azul de *comassie*. O azul de *comassie* é um corante inorgânico que se liga às proteínas através de ligações iónicas entre grupos de ácido sulfónico e os amino positivos das proteínas, assim como através de atracções de *Van der Waals*, e permite detectar entre 30 a 100ng de proteína, por banda, em géis de poliacrilamida (Tabela 2.3). O gel obtido permaneceu na solução de *comassie* (2,5g de *Comassie Blue Brilliant R-250*- Sigma- em 400ml Metanol, 100ml de Ácido Acético e 450ml de Água) até à obtenção de uma coloração uniforme (cerca de 12h de contacto). Após este tempo, executou-se a descoloração do gel, para visualização das bandas, com um tampão de descoloração (70% Água, 10% Ácido Acético e 20% de Metanol).

**Tabela 2.3** – Preparação de um gel para SDS-PAGE.

15%		Solução Stacking	
ProctoGel	6,25 ml	ProctoGel	650 µl
Solução Butter	3,25 ml	ProtoGel, Stacking Butter	1,25 ml
Água	2,862 ml	Água	3,050 ml
APS 10%	100 µl	APS 10%	50 µl
Tened	10 µl	Tened	7,5 µl

Com o objectivo de obter a proteína LysB purificada, efectuou-se uma diálise das fracções seleccionadas em PBS (kit Cellu step2, Orange scientific), durante 24h.

Determinou-se, a concentração final de proteína através do método de *Bradford*, utilizando soro de albumina bovina (14) como padrão (Tabela 2.4) <sup>(57,58)</sup>.

**Tabela 2.4** – Preparação da curva de calibração com BSA.

Padrões	Quantidade de BSA	Quantidade de Água	Quantidade Biorad Proteín Assay
5 µg	5 µl	795 µl	200 µl
10µg	10 µl	790 µl	200 µl
15µg	15 µl	785 µl	200 µl
20µg	20 µl	780 µl	200 µl
25µg	25 µl	775 µl	200 µl
Proteína	4 µl	796 µl	200 µl
Branco	--	800 µl	200 µl

### 2. 2.2. Actividade Biológica da LysB

Para estudar a actividade da proteína LysB nas diferentes condições em estudo adicionaram-se 120µg/ml de LysB purificada a uma cultura de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, com uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,200. O efeito da proteína LysB no crescimento de *M. smegmatis* foi avaliado por leitura da densidade óptica e/ou contagem de colónias a intervalos de tempo definidos.

### 2. 3. Produção das Nanopartículas (nsLp)

Com base em estudos descritos na literatura, preparou-se as nanopartículas (nsLp) <sup>(144)</sup>.

As nanopartículas lipídicas são preparadas com base em lípidos, concretamente glicerolípidos, sólidos à temperatura ambiente. As matérias-primas utilizadas encontram-se descritas na Farmacopeia EP 5 (2005) como excipientes farmacêuticos. Estas são lípidos

maioritariamente utilizados em formulações de fármacos pouco solúveis, com o fim de diminuir os problemas de solubilidade e melhorar a sua biodisponibilidade. A selecção adequada do lípido permite o desenvolvimento de sistemas transportadores de fármacos específicos para os fins a que se destinam.

As formulações foram estabilizadas recorrendo a um agente tensioactivo não iónico, o polissorbato 80 (Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano) que apresenta um valor de EHL= 15 (Equilíbrio Hidrófilo lipófilo) (FP 8). Este agente possui a capacidade de formar uma película resistente na região da interfase, o que confere maior estabilidade às formulações das quais faz parte. É um excipiente sobejamente conhecido, habitualmente utilizado na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética.

Para a fase aquosa e, para as diluições necessárias aos métodos de caracterização, utilizou-se água purificada (FP8).

### **2. 3.1. Preparação das Nanopartículas**

O método proposto pela literatura <sup>(144)</sup> divide-se em três etapas principais:

- 1- Fusão da fase lipídica a uma temperatura superior em 20°C à descrita como necessária para fundir o lípido e aquecimento da solução aquosa de tensioactivo à mesma temperatura.
- 2- Mistura a quente, seguida de homogeneização por emulsificação das fases (Silverson Machine, Inglaterra), em reactor de vidro tipo I.
- 3- Embalagem e arrefecimento da preparação de nanopartículas.



**Figura 2.1** – Representação esquemática do sistema operativo utilizado para a preparação de dispersões coloidais de partículas lípidicas-nsLp. Retirado de Videira, 2008 <sup>(144)</sup>.

**Tabela 2.5** – Parâmetros estabelecidos, de acordo com a literatura para a produção nsLp.

Condições do método de fusão/emulsificação	
Volume	100 ml
Agitação	14.000 (r.p.m.)
Tempo de preparação	10 min.
Temperatura	Superior em 20°C ao ponto de fusão (p.f.) do lípido

### 2. 3.2. Caracterização das Nanopartículas

Caracterizou-se as nsLp, de acordo com os procedimentos descritos na literatura <sup>(144,</sup>

<sup>146)</sup>. Assim procedeu-se às seguintes determinações:

- **Determinação do diâmetro médio**

Para determinar o diâmetro médio da partícula (78) e o índice de polidispersão ( $I_p$ ) da dispersão utilizou-se a espectrofotometria de correlação de fotões (PCS; Autosizer Malvern Instruments IV, Reino Unido).

- **Determinação da carga eléctrica superficial**

A carga superficial, traduzida pelo valor do potencial Zeta, foi medida após diluição das amostras em água purificada (20 $\mu$ l:1ml) (Malvern Zetasizer IV, Reino Unido).

- **Análise Morfológica**

A análise morfológica das partículas foi executada por análise de microfotografias obtidas por microscopia electrónica de transmissão (TEM; Philips, CM 120 Biotwin).

- **Determinação do número de partículas**

O número de partículas foi determinado através de um método espectrofotométrico baseado nos valores de  $dm$  e na turbidez da amostra.

- **Estabilidade física das preparações**

Para avaliar o intervalo de tempo ao longo do qual as nsLp se mantêm inalteradas, procederam-se a estudos de estabilidade nas preparações. Avaliou-se a integridade dos sistemas nsLp aos tempos 30 dias e aos 3 meses, com as preparações mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. De acordo com a literatura estas preparações são estáveis por períodos superiores a 24 meses.

## **2. 4. Produção do sistema nsLp\_LysB**

Promoveu-se, por contacto, durante 1h, à temperatura ambiente e com o auxílio de agitação suave e constante, a adsorção da LysB às nsLp. Através deste procedimento adsorveu-se uma quantidade de proteína equivalente a 120 µg/ml a várias concentrações de nsLp.

### **2. 4.1. Eficiência da adsorção**

Determinou-se a eficiência do processo, após a formação do sistema nsLp\_LysB. Desta forma, centrifugou-se o sistema obtido com o auxílio de centrífugas. Recolheu-se, após centrifugação, a quantidade de proteína não adsorvida.

A concentração final de proteína não adsorvida foi determinada pelo método de *Bradford*, utilizando BSA como padrão.

### **2. 4.2. Determinação do diâmetro médio do sistema nsLp\_LysB**

Determinou-se o diâmetro médio das partículas após a adsorção da proteína LysB, de acordo com o método referido na alínea 2.3.2.

## **2. 5. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp\_LysB**

### **2. 5.1. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp\_LysB em culturas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155**

Com o objectivo de avaliar o efeito do sistema nsLp\_LysB, “*in vivo*”, testou-se várias concentrações de nsLp\_LysB. Assim, adicionou-se as várias formulações preparadas a culturas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, com uma DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,200, e seguiu-se a cinética de crescimento por leitura da densidade óptica a intervalos de tempo pré-definidos, procedimento semelhante ao executado para a proteína livre. A cada tempo recolheram-se

alíquotas de todas as condições em estudo e plaqueou-se várias diluições, para posterior determinação das CFU.

Neste ensaio utilizou-se o 7H9 como meio de cultura para o crescimento bacteriano. Ao meio de cultura adicionaram-se tensioactivos diferentes. Para algumas condições utilizou-se 0,05% de Brij 35, enquanto que para outras 0,05% de Tween 80.

### **2. 5.2. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp\_LysB em linhas celulares de macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155**

- **Linha Celular**

Para este ensaio usou-se macrófagos de ratinho da linha celular J774A.1, que foram crescidos e mantidos em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Difco\_Invitrogen) com 0,01% de piruvato e alta concentração de glucose (4,5 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Difco) e de 20 mM de glutamina.

- **Culturas de Macrófagos**

Após a aderência das células à caixa de cultura de tecidos, cerca de 30 minutos após o plaqueamento, substituiu-se o meio, para retirar o dimetilsulfóxido (DMSO) existente na mistura de congelação. Os macrófagos cresceram até cerca de 80% de confluência (cerca de 2 dias) numa caixa de cultura de tecidos de 10 cm de diâmetro, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após o crescimento, raspou-se a placa com um "cell scraper" e ressuspendeu-se as células em 10 ml de meio DMEM.

Seguidamente, aplicou-se 1 ml de meio DMEM suplementado a 10% com SFB em cada poço da caixa de cultura de tecidos de 24 poços. A todos eles adicionou-se uma gota, da suspensão obtida anteriormente e incubou-se a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### A. Estudo de Citotoxicidade

#### - Método de exclusão com azul de tripano

A uma placa de 24 poços com macrófagos a 80% de confluência adicionou-se os sistemas em estudo: nsLp, LysB, nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2. Promoveu-se o contacto durante 24h. Após 1h e 24h de contacto promoveu-se a coloração das células com Azul de tripano para contagem do número de células viáveis. Assim, a cada tempo, lavou-se as células com PBS, duas vezes consecutivas. Colocou-se nos poços 300 µl de Azul de tripano e deixou-se actuar durante 5 minutos. Seguidamente lavou-se com PBS para retirar o excesso de corante e adicionou-se 300 µl de paraformaldeído a 30% (93). Após 15 minutos (tempo de fixação das células) lavou-se os poços novamente com PBS e observou-se ao microscópio óptico para contagem do número de células viáveis.

#### -Coloração com rodamina-faloidina.

A uma placa de 24 poços com macrófagos a 80% de confluência adicionou-se os sistemas nsLp e nsLp\_LysB. Promoveu-se o contacto durante 24h. Após 1h e 24h de contacto promoveu-se a coloração das células com rodamina-faloidina para identificar a origem da morte celular. Após eliminação do meio e lavagem com PBS, fixou-se as células com PFA a 3% durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, permeabilizou-se as células com Triton x-100 a 1% em PBS durante 3 minutos. Lavou-se três vezes consecutivas com PBS/glicina e bloqueou-se a reacção com solução bloqueio (2% soro fetal bovino, 1% de albumina fracção V, em PBS/glicina) durante 15 a 20 minutos. Seguidamente, promoveu-se à coloração com rodamina-faloidina e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente.

## B. Estudo da actividade do sistema nsLp\_LysB

- Preparação do inóculo e infecção da linhagem celular

A partir de uma cultura de *M. smegmatis* em meio líquido, em fase exponencial, preparou-se uma suspensão contendo cerca de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml. Para tal, retirou-se um volume de 1 ml da cultura inicial em fase exponencial de crescimento e diluiu-se em PBS, fazendo-se a posterior centrifugação durante 3 minutos, a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e fez-se a diluição do sedimento em PBS até se obter uma densidade óptica de 0,2 a 600 nm, correspondente a  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml aproximadamente. O inóculo foi colocado durante alguns minutos num banho de ultra-sons para garantir a dispersão dos bacilos e evitar a formação de agregados.

Para a infecção de macrófagos, do inóculo  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml lavado duas vezes em PBS foi preparado um inóculo com  $1,0 \times 10^7$  UFC/ml em meio DMEM com 10% de SFB. O inóculo foi posto durante alguns minutos num banho de ultra-sons para garantir a dispersão dos bacilos e evitar a formação de agregados. Os possíveis aglomerados de micobactérias foram desfeitos passando as células por uma seringa de agulha fina, de forma a garantir a fagocitose individual de cada bacilo.

Os macrófagos com cerca de 80% de confluência foram infectados com um inóculo micobacteriano cuja concentração permitiu obter uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 10:1 (bacilos /macrófago).

- **Ensaio 01:** Actividade biológica do sistema nsLp\_LysB com infecção prévia dos macrófagos com *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Infectou-se os macrófagos a 80% de confluência com uma m.o.i. de 10:1 promovendo-se o contacto destes com o inoculo bacteriano durante 1h, para garantir a internalização da maior percentagem de bacilos. Seguidamente, e de forma a eliminar os bacilos não fagocitados, retirou-se o meio DMEM e lavou-se os poços, três vezes consecutivas com PBS. Para recuperar as micobactérias que sobreviveram intracelularmente, lisou-se os macrófagos infectados de um dos poços com uma solução de Igepal a 1% (Sigma-Aldrich) em água, executando-se posteriormente o plaqueamento de várias diluições em água destilada estéril do lisado. As diluições foram preparadas numa placa de 96 poços (Orange scientific) pelo método das diluições seriadas e as aplicações em meio sólido foram efectuadas em duplicado. Avaliou-se a contagem das UFC após incubação a 37°C em meio mico.

Nos restantes poços substituiu-se o meio, e adicionou-se os sistemas em estudo (nsLp; LysB; nsLp\_LysB; [nsLp\_LysB]/2). Seguiu-se o ensaio durante 24h, por ser uma estirpe de crescimento rápido. A tempos pré-definidos (1h; 4h; 8h; 24h) lisou-se os macrófagos dos poços correspondentes com uma solução de Igepal a 1% (Sigma-Aldrich) em água, para recuperar as micobactérias que sobreviveram intracelularmente. Preparou-se diluições do lisado obtido, em água destilada estéril, tal como anteriormente referido, e plaqueou-se em meio mico. Avaliou-se a contagem das UFC após incubação a 37°C.

- **Ensaio 02:** Actividade biológica do sistema nsLp\_LysB após o contacto prévio dos macrófagos com o sistema e posterior infecção por *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Promoveu-se o contacto inicial dos macrófagos com os sistemas em estudo (nsLp; LysB; nsLp\_LysB; [nsLp\_LysB]/2) durante 1h. Após este período de tempo substituiu-se o

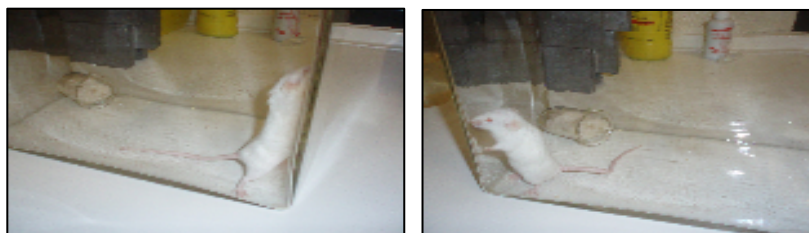
---

meio contendo os sistemas por novo meio e iniciou-se a infecção dos macrófagos a 80% de confluência com uma m.o.i. de 10:1, por contacto destes com o inóculo bacteriano de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 durante 1h. Seguiu-se o ensaio durante 24h e a tempos pré-definidos (1h; 4h; 8h; 24h) lisou-se os macrófagos dos poços correspondentes com uma solução de Igepal a 1% (Sigma-Aldrich) em água. Preparou-se diluições do lisado em água destilada estéril, tal como anteriormente referido e plaqueou-se em meio mico. Avaliou-se a contagem das UFC após incubação a 37°C.

## 2.6. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp\_LysB em macrófagos peritoneais infectados com *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

- Sacrifício do animal

De acordo com a legislação em vigor, sacrificou-se os animais por *overdose* anestésica com clorofórmio, provocando uma depressão respiratória, indolor (Figura 2.2).



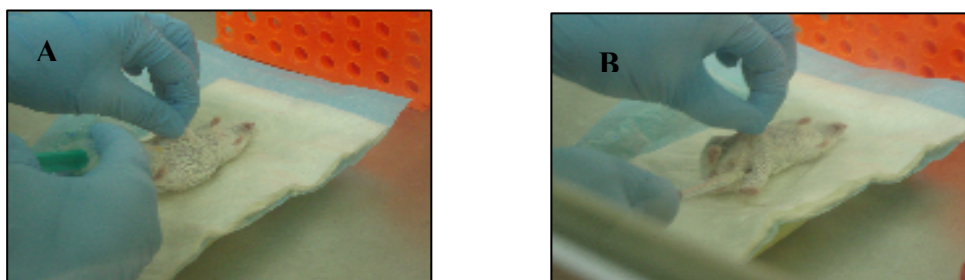
**Figura 2.2** – Câmara fechada utilizada para sacrifício do animal por *overdose* anestésica com clorofórmio.

- Colheita de macrófagos peritoneais

Após a introdução de todo o material necessário à realização da experiência na câmara de fluxo laminar, encheu-se duas seringas de 5 ml/ratinho com uma agulha de 21 G\*1 com

---

PBS estéril. Desinfectou-se, com álcool a 75°, e colocou-se o animal sacrificado no interior da câmara de fluxo laminar, em decúbito dorsal. Seguidamente injectou-se o PBS na cavidade abdominal do ratinho, utilizando para o efeito seringas de 5 ml com agulhas de G\* 5/8 - 0,5\* 16 mm. Durante 1 a 2 minutos efectuou-se uma massagem abdominal, para aumentar o número de macrófagos nesta cavidade. Após a massagem, executou-se a colheita do líquido peritoneal com seringas de 1 ml e agulha de 19 G\* 1 - 1,1\* 25 mm (Figura 2.3).



**Figura 2.3** – Recolha dos macrófagos peritoneais após o sacrifício do animal por *overdose* anestésica com clorofórmio. (A) Injecção de PBS na cavidade abdominal do ratinho. (B) Colheita do líquido peritoneal.

- Isolamento de macrófagos peritoneais

Efectuou-se a centrifugação (Multifuge 1 L-R, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Germany) do líquido peritoneal recolhido durante 10 min, a 1100 rpm, e a uma temperatura de 4° C. Ressuspendeu-se o *pellet* em meio RPMI 1640 completo (Ref. R 0883, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) com 10% de SFB (Gibco. Faetal Bovine Serum/ Heat inactivated Ref. 10500-064).

- “Cultura” dos macrófagos peritoneais

Após a ressuspensão do *pellet*, efectuou-se a distribuição das células em caixas de cultura de 24 poços estéreis e colocou-se as mesmas a incubar, durante 5 horas a 37°C com

5% CO<sub>2</sub>. No final do tempo de incubação removeram-se as células não aderentes e quaisquer substâncias indesejáveis, por meio de 2 a 3 lavagens consecutivas com PBS estéril. Finalmente, incubou-se os macrófagos isolados em novo meio de cultura, nas mesmas condições, durante 24 horas.

- Preparação do inóculo de *M. smegmatis* e infecção celular dos macrófagos peritoneais

A partir de uma cultura em meio líquido, em fase exponencial, preparou-se uma suspensão de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml. Para tal, retirou-se um volume de 1 ml da cultura inicial em fase exponencial de crescimento e diluiu-se em PBS, fazendo-se a posterior centrifugação durante 3 minutos, a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante e diluiu-se o sedimento em PBS até obtenção de uma DO<sub>600</sub> de 0,2, correspondente a  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml. De forma a garantir a dispersão dos bacilos e evitar a formação de agregados colocou-se o inóculo preparado, durante alguns minutos, num banho de ultra-sons.

Para a infecção de macrófagos peritoneais, com o inóculo  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml lavado duas vezes em PBS preparou-se um segundo inóculo com  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml em meio RPMI com 10% de SFB. Procedeu-se, para este efeito, de modo semelhante ao anteriormente referido. Contudo, e para garantir a fagocitose individual de cada bacilo, passou-se ainda os possíveis aglomerados de micobactérias por uma seringa de agulha fina para que pudessem ser eliminados. Seguidamente, infectou-se os macrófagos peritoneais com o inóculo micobacteriano preparado anteriormente, obtendo-se uma m.o.i. de 10:1 (bacilos /macrófago).

- Actividade biológica do sistema nsLp\_LysB

Para garantir a internalização dos bacilos promoveu-se a infecção dos macrófagos por um período de 1h. Em seguida, e com o objectivo de eliminar os bacilos não fagocitados, retirou-se o meio RPMI e lavou-se os poços com PBS por 3 vezes consecutivas. Posteriormente, e para recuperar as micobactérias que sobreviveram intracelularmente, lisou-se os macrófagos com uma solução de Igepal a 1% (Sigma-Aldrich) em água, plaqueou-se e incubou-se em meio mico, a 37°C. Aos restantes poços adicionou-se os componentes em estudo. Após 1h de contacto com os mesmos promoveu-se a substituição do meio e seguiu-se a infecção durante 24h. A tempos pré-determinados lisou-se os macrófagos e procedeu-se como referido anteriormente.

Após o período de incubação das placas de meio mico efectuou-se as contagens das UFC.

## **2. 7. Estudo da actividade Biológica do sistema nsLp\_LysB em culturas de *M. tuberculosis*.**

Com o objectivo de verificar o efeito do nosso sistema nsLp\_LysB, *in vivo*, em estirpes patogénicas, adicionou-se, a uma estirpe clínica de *M. tuberculosis*, em crescimento, a concentração eficaz pré-determinada de nsLp\_LysB (125µl de nsLp com 120 µg/ml de LysB). Neste ensaio utilizou-se, para o crescimento bacteriano, tubos de 7ml de BBL MGIT. Após a adição do composto incubou-se os tubos no BACTEC MGIT 960, aparelho específico para seguimento da cinética de crescimento bacteriano, a uma temperatura de 37°C.

## 2. 8.        **Extracção de Lípidos Totais das micobactérias**

Com o objectivo de observar uma possível alteração do perfil lipídico das micobactérias tratou-se os lípidos totais de *M. smegmatis*, com os compostos em estudo.

Os lípidos totais de *M. smegmatis* foram extraídos de acordo com o protocolo descrito por Eckstein *et al* (2006) <sup>(46)</sup>. Centrifugaram-se as culturas de *M. smegmatis*, em fase exponencial de crescimento, a 4000 rpm durante 15 min. O pellet obtido foi congelado durante 2h a -70°C e de seguida foi liofilizado. A fracção lipídica constituinte da parede micobacteriana foi extraída com uma solução de clorofórmio/metanol (2:1) a 55°C. Após 3h de incubação, centrifugaram-se os extractos a 4000 rpm durante 10 min e a fracção clorofórmica foi recuperada e seca sob uma corrente de azoto. Seguidamente, efectuou-se uma lavagem de *Folch*, que consiste na adição de uma solução de 6ml de clorofórmio/metanol (2:1) e 1ml de água. Homogeneizou-se as duas fases com o auxílio do *vortex*, e em seguida, centrifugou-se as amostras a 4000 rpm durante 10 min. Transferiu-se a fase orgânica (que contém os lípidos) para um novo tubo e secou-se a mesma sob uma corrente de azoto. Finalmente, pesou-se os extractos secos e ressuspendeu-se em clorofórmio/metanol (2:1).

## 2. 9.        **Acção de LysB e nsLp nos lípidos totais das micobactérias.**

A análise das fracções lipídicas tratadas e não tratadas foi efectuada por cromatografia em camada fina (TLC- *Thin Layer Chromatography*). Assim, aplicou-se 20 µl de cada uma das amostras numa placa de alumínio coberta de sílica gel 60 F254 (Merck) e as placas foram eluídas com o sistema de solvente clorofórmio/metanol/água (90:10:1, v/v). Em seguida revelou-se as placas, através da pulverização das mesmas com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10% e posterior aquecimento.

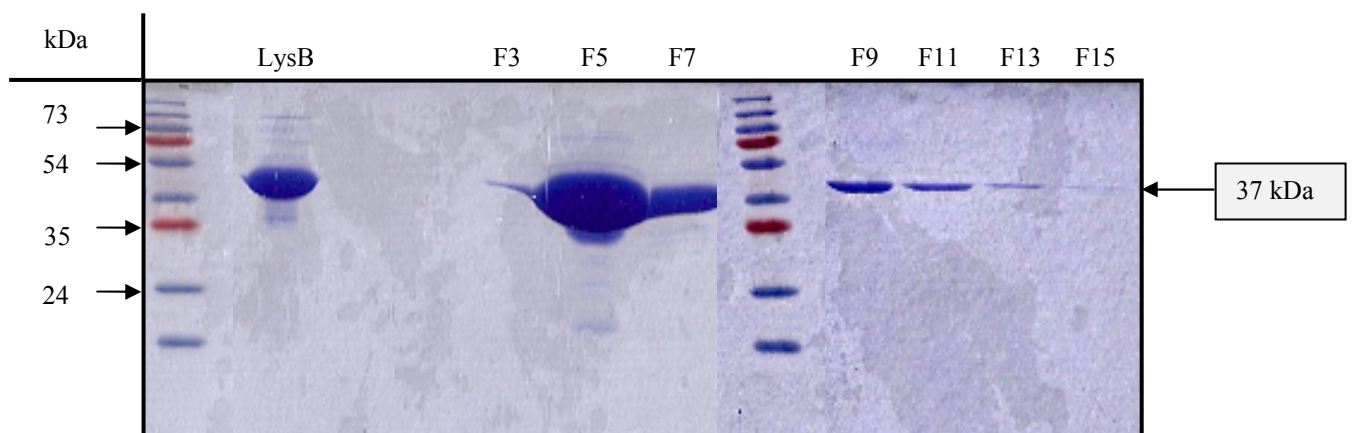
---

## Capítulo 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Produção da proteína LysB

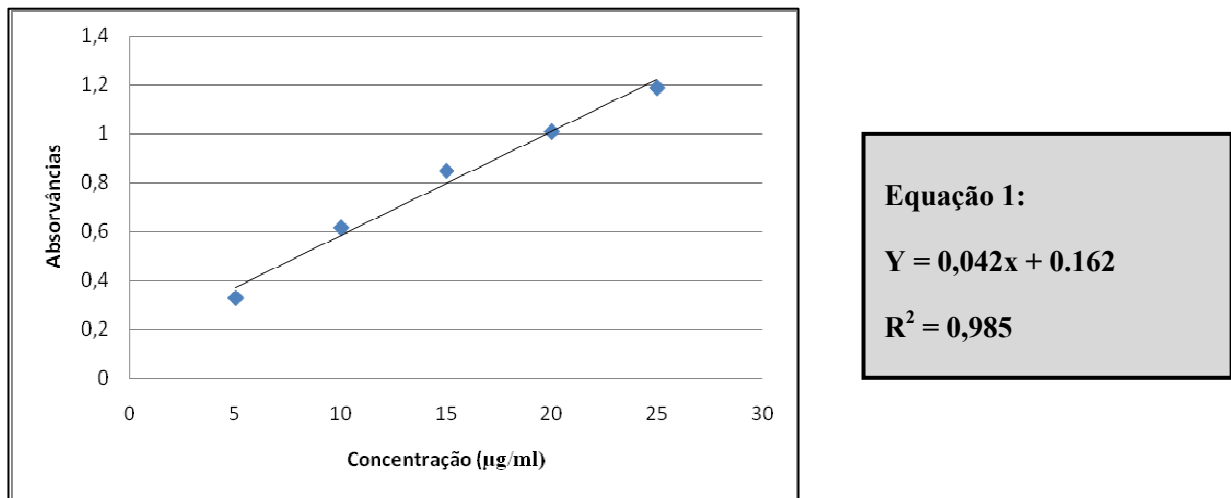
#### 3.1.1. Purificação da LysB

A proteína LysB foi produzida em *E. coli* JM109 a partir de um plasmídeo recombinante (pMP302). Neste plasmídeo, o gene *lysB* foi clonado de modo a originar uma proteína recombinante com uma cauda de histidinas em N-terminal. Após a indução da expressão com IPTG e lise das células, o extracto total foi purificado por cromatografia de afinidade com uma resina carregada com  $\text{Ni}^{2+}$  (Quiagen). Foram recolhidas as 15 fracções posteriormente e analisadas por SDS-PAGE (Figura 3.1).



**Figura 3.1** – SDS-PAGE das fracções ímpares recolhidas na purificação de LysB. O gel foi corado com azul de *comassie*. Os pesos moleculares do marcador encontram-se indicados à direita. À esquerda aparece a indicação da proteína LysB com o peso molecular esperado (37kDa).

Pela análise do gel seleccionaram-se as fracções F<sub>3</sub> a F<sub>13</sub>. Estas foram submetidas a um processo de diálise em tampão PBS. Após a diálise, determinou-se a concentração final de LysB pelo método de *Bradford*, usando a BSA como padrão (Figura 3.2).



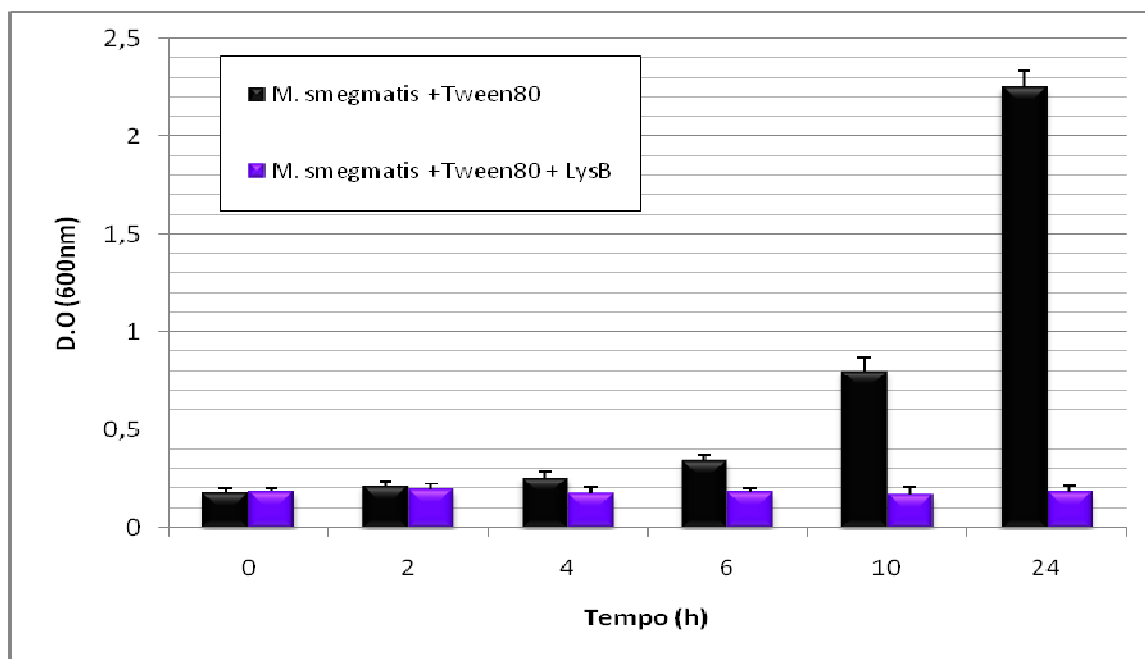
**Figura 3.2** - Curva de calibração da proteína BSA obtida pelo método de *Bradford*.

A partir da curva padrão obtida, calculou-se a concentração da proteína LysB. O valor de 2,58 mg/ml encontra-se dentro do intervalo de resultados descritos por Gil (2008)<sup>(57)</sup>, em ensaios anteriores.

### 3. 1.2. Efeito da LysB no crescimento de *M. smegmatis*

Estudos anteriores sugerem que a adição de LysB a uma cultura de *M. smegmatis* resulta na inibição do crescimento bacteriano<sup>(57)</sup>. Assim, com o objectivo de avaliar a funcionalidade da proteína LysB produzida testou-se, do mesmo modo, o seu efeito no crescimento bacteriano de *M. smegmatis*. Adicionaram-se 120 µg/ml de LysB purificada a

uma cultura de *M. smegmatis*, em fase exponencial de crescimento. A acção de LysB foi monitorizada por leitura da densidade óptica a 600 nm durante 24h (Figura 3.3).

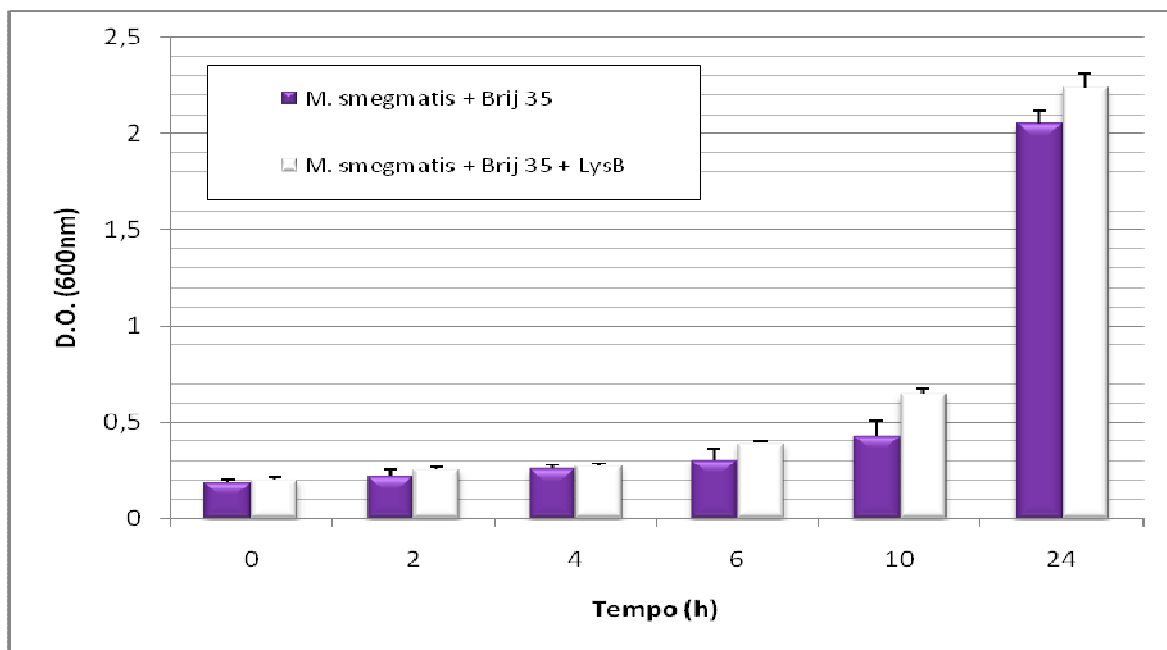


**Figura 3.3** - Variação da  $DO_{600}$  das culturas de *M. smegmatis* (com 120  $\mu\text{g/ml}$  de LysB e sem proteína), na presença de Tween 80 durante 24h.

Os resultados obtidos confirmam que na presença da proteína LysB há inibição do crescimento de *M. smegmatis*, embora este fenómeno só se observe na presença de Tween 80. Na ausência de Tween 80 não se observou qualquer inibição do crescimento bacteriano (Figura 3.4), o que sugere que pode existir uma dependência da actividade da proteína em agentes tensoactivos. É do conhecimento geral, que a ausência de substâncias detergentes em culturas de micobactérias resulta numa agregação das culturas bacterianas. Como tal, o acesso da enzima ao seu alvo terapêutico poderá, de alguma forma, estar dificultado. Assim testou-se, de seguida, a actividade da LysB numa cultura de *M. smegmatis* suplementado com Brij

35, um tensoactivo não iónico, tal como o Tween 80. Os resultados representados na figura 3.4 mostram que não existe inibição do crescimento na presença daquele tensoactivo. Os dados obtidos indicam ainda que o tensoactivo será específico para a LysB. De facto a dependência de agentes tensoactivos específicos já havia sido descrita para outras enzimas com actividade lipolítica. Segundo alguns autores, a apresentação do substrato lipídico sob a forma de uma dispersão micelar facilita a exposição do centro activo da proteína, tornando-a eficaz<sup>(33, 57)</sup>.

Os resultados indicam que na presença de Brij 35 não há redução do crescimento bacteriano e, a actividade da biomolécula não se verifica.



**Figura 3.4** - Variação da DO<sub>600</sub> das culturas de *M. smegmatis* (com 120 µg/ml de LysB e sem proteína), na presença de Brij 35 durante 24h.

### 3.2. Adsorção da LysB em nsLp

Foi objectivo do presente estudo a preparação de um sistema transportador capaz de direccionar moléculas com actividade farmacológica a células-alvo. Preparou-se um sistema de veiculação coloidal com base em lípidos sólidos pelo método proposto por Videira (2008) <sup>(144)</sup>.

O método tradicional para a adsorção de proteínas a superfícies carregadas é denominado de adsorção por incubação. Esta abordagem é vantajosa relativamente à encapsulação dado que não compromete a estrutura da proteína e consequentemente a sua actividade. Desta forma, promoveu-se a adsorção de LysB à superfície das nanopartículas por incubação por um período de 1h sob condições previamente seleccionadas.

Após este tempo a fracção correspondente à proteína livre foi separada por centrifugação/ultracentrifugação e a sua concentração determinada. A percentagem de proteína adsorvida foi calculada de acordo com a equação 2 frente a uma curva de calibração utilizando BSA como padrão.

**Equação 2:**

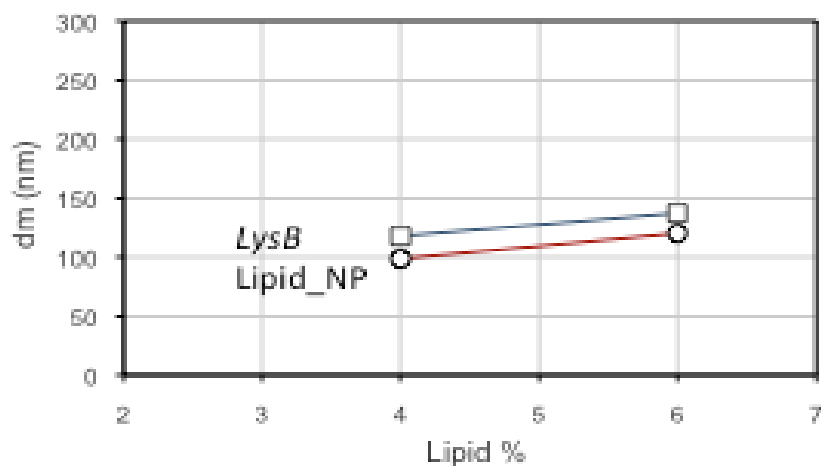
$$\% \text{ adsorção} = \frac{\text{Proteína Final} - (\text{Proteína Sobrenadante} - \text{Proteína Inicial})}{100}$$

Os resultados expressos em percentagem de proteína incorporada sugerem que estamos perante uma adsorção em monocamada (Higushi), indicando que a proteína se distribuiu uniformemente pela superfície das partículas dispersas (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** – Eficiência de adsorção da LysB às nsLp, por incubação com uma concentração inicial de proteína de 1033,4. (A) Percentagem de lípido, (B) Diâmetro médio de nsLp\_LysB, (C) Concentração de LysB no sobrenadante, (D) Eficiência de adsorção.

A (%)	B (nm)	LysB em solução após 1h de adsorção (C) (n=6)	Percentagem de LysB adsorvida (D) (n=6)
3	137,4	4,15 µg	99,50% ± 0,6
3	120,3	3,64 µg	99,60% ± 0,6

Relativamente ao valor do diâmetro médio das partículas dispersas, os resultados indicam que estamos na presença de um sistema de nanopartículas lipídicas com uma população de tamanho homogêneo, cerca de  $98,6 \pm 4,0$  nm (3% de lípido m/m). O valor médio aumenta para concentrações superiores de lípidos (6% m/m) sem que se verifique o alargamento da distribuição de tamanhos (Figura 3.5).



**Figura 3.5** – Valor do diâmetro médio das partículas dispersas em função da percentagem de Lípido.

A presença de proteína à superfície das partículas, adsorvida por interações fracas, contribui igualmente para o aumento do diâmetro médio sendo este, no entanto, de valor residual ( $120,3 \pm 2.6$  nm; 3% de lípido).

Os resultados estão de acordo com os sistemas transportadores coloidais, uma vez que são constituídos por nanopartículas lipídicas de estrutura reticulada, que permitem reter ou adsorver à sua superfície, moléculas activas e promover, a partir dele, a libertação lenta dos mesmos <sup>(144)</sup>.

Adicionalmente, o facto de o processo de preparação de nsLp e, mais tarde nsLp\_LysB, envolver a utilização de lípidos polares permite o desenvolvimento de carga à sua superfície, contribuindo de forma decisiva para a interacção com a proteína, na interfase. O valor do diâmetro médio apresentado pelas nanopartículas lipídicas e a sua respectiva área de superfície são também parâmetros importantes. As dimensões submicrométricas da entidade dispersa concorrem para um elevado incremento da área de superfície, contribuindo para as propriedades únicas das dispersões coloidais <sup>(108, 144)</sup>.

Os valores obtidos de concentração de proteína adsorvida, através da metodologia realizada, um método de adsorção simples, indicam e confirmam o elevado potencial destas nanopartículas para funcionar como sistemas coloidais de transporte de moléculas activas, mais especificamente, a sua eficácia no transporte de proteínas.

Comparativamente a outros estudos em que se utilizaram diferentes sistemas de partículas, podemos afirmar que as nsLp representam um sistema coloidal eficaz no transporte de moléculas activas, uma vez que a eficiência de incorporação é de cerca de 99,5 %. De facto, os estudos descritos por Ahmad *et al* (2008) apresentam uma eficiência de incorporação inferior <sup>(3)</sup>. Neste estudo, os autores, incorporaram moxifloxacina em nanopartículas constituídas por PLG, obtendo uma eficiência de incorporação que não ultrapassa os 56,07%

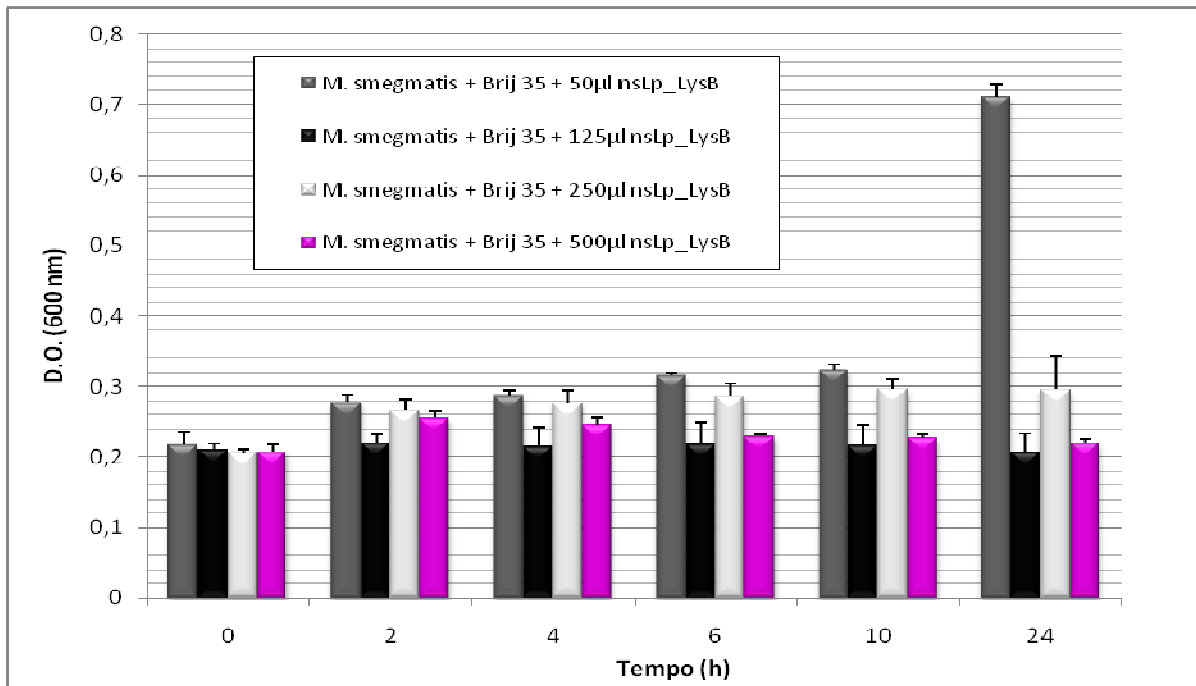
---

<sup>(3)</sup>. Também Kisisch *et al* (2007) promoveu a incorporação de Moxifloxacina em nanopartículas de poli(butil-cianoacrilatos) sem que a eficiência do processo atingisse os 52,9% <sup>(77)</sup>. Estes dados levam-nos a sugerir que a natureza lipídica das nsLp concorre para a elevada eficácia dos sistemas.

### **3.3. Actividade Biológica do sistema nsLp\_LysB**

#### **3.3.1. Estudo da actividade de nsLp\_LysB em culturas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155**

Após preparação do sistema nsLp\_LysB o passo seguinte consistiu na avaliação da sua actividade sobre células de *M. smegmatis*. Adoptou-se um procedimento semelhante ao executado nos estudos com a proteína livre, mas em que foram testadas concentrações crescentes do sistema nsLp\_LysB. Uma vez que a concentração de proteína eficaz já havia sido determinada (120 µg/ml), para a formulação deste sistema utilizou-se uma concentração de proteína constante, fazendo-se variar apenas o volume final da dispersão de nanopartículas entre 50µl e 500µl, correspondente a  $2,43 \times 10^{10}$  e  $2,43 \times 10^{11}$  partículas/ml, respectivamente. Para a realização do ensaio, adicionou-se ao meio de cultura Brij 35, de forma a evitar a formação de aglomerados de micobactérias. A adição de agentes tensioactivos tem como objectivo homogeneizar as culturas de modo a permitir a leitura da densidade óptica. O efeito sobre o crescimento bacteriano foi avaliado através da leitura das densidades ópticas de suspensões celulares a 600nm em períodos de tempo pré-determinados, até às 24h (Figura 3.6).

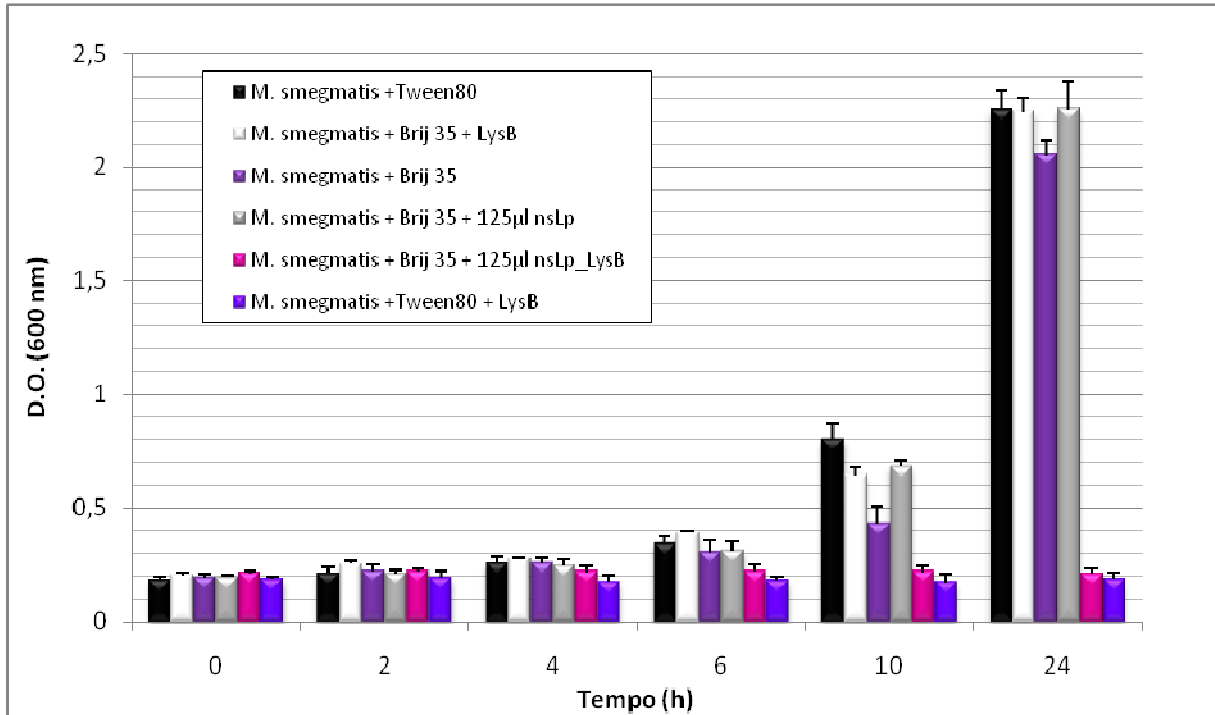


**Figura 3.6** – Variação da  $DO_{600}$  das culturas de *M. smegmatis* por adição de diferentes concentrações de nsLp ao sistema nsLp\_LysB (120 µg/ml de proteína). O ensaio realizou-se na presença de Brij 35.

É possível observar um efeito inibidor do crescimento de *M. smegmatis*, para concentrações de nsLp/ml superiores a  $2,43 \times 10^{10}$  partículas/ml (50 µl nsLp/LysB). Este facto pode estar relacionado com o menor número de partículas transportadoras disponíveis para a mesma concentração de proteína. Deste modo, ao existir uma maior concentração de proteína livre e, à semelhança do que ocorreu no ensaio anterior, na presença de Brij 35 a proteína LysB livre não é eficaz.

Com base nestes resultados, seleccionou-se a menor quantidade de nsLp eficaz (125 µl nsLp) para prosseguir os estudos. Assim, o passo seguinte foi comparar a actividade do sistema seleccionado, com a proteína livre, em diferentes condições.

Os resultados relativos à variação da densidade óptica de cada uma das amostras encontram-se registados na figura 3.7.



**Figura 3.7** – Variação da  $DO_{600}$  das culturas de *M. smegmatis* por adição da proteína livre (120 µg/ml de LysB) a culturas com Tween 80 e com Brij 35 e por adição de nsLp vazias, e do sistema nsLp\_LysB em culturas com Brij 35, durante 24h.

A actividade da proteína livre está de acordo com o anteriormente observado, isto é, verifica-se a inibição do crescimento às 24h na presença de Tween 80, não se observando esta redução na presença de Brij 35. Pelo contrário, o sistema nsLp\_LysB mostrou-se eficaz, mesmo na presença de Brij 35, o que indica que a actividade da proteína nanoincorporada é independente do tensioactivo utilizado, mostrando-se um modelo eficaz para apresentação de proteína aos substratos.

Utilizando o mesmo sistema, uma vez observada a eficácia com o sistema nsLp\_LysB, pretendeu-se verificar se era possível observar o mesmo efeito com metade da concentração testada [nsLp\_LysB]/2. Neste ensaio, utilizou-se metade das concentrações de nsLp e LysB.

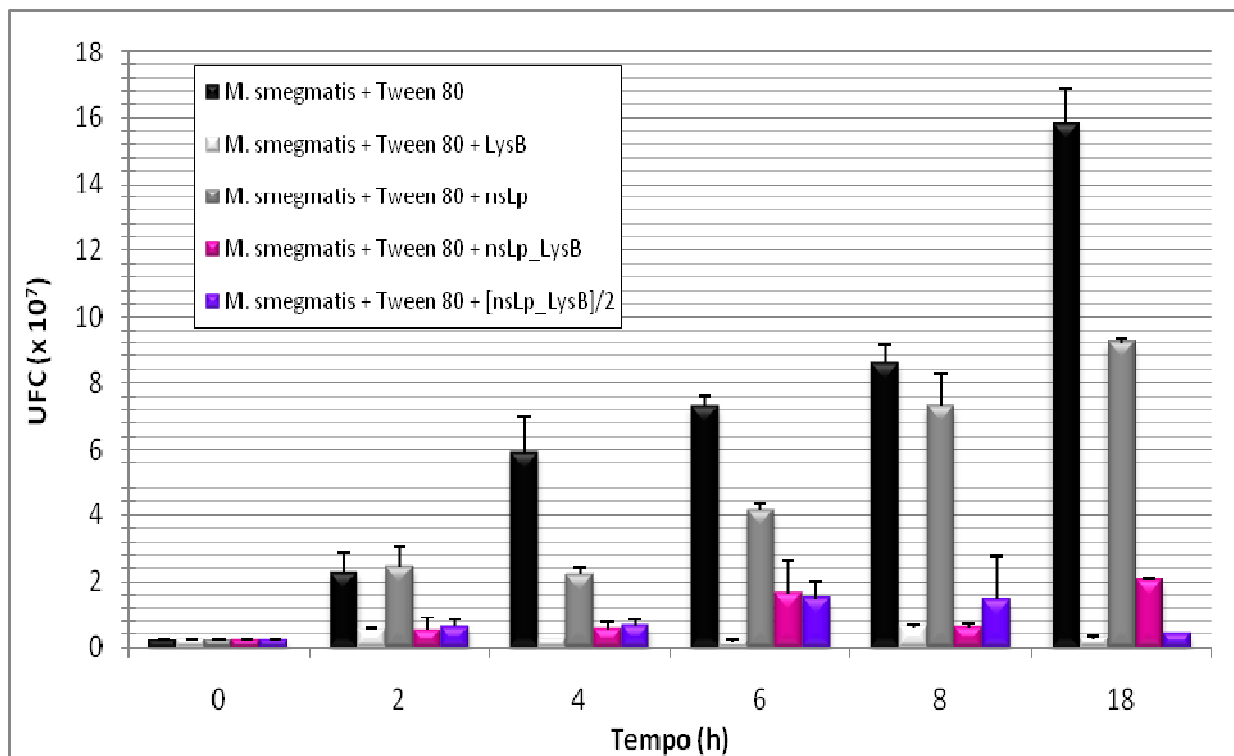
### 3.3.1. Avaliação da actividade de nsLp\_LysB na viabilidade de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

Os resultados até agora obtidos resultam de um método de leitura da densidade óptica, que não reflecte a viabilidade das células presentes. Assim sendo, e com o objectivo de validar os resultados previamente obtidos, procedeu-se a ensaios de actividade sobre o *M. smegmatis* com a quantificação do número de bactérias viáveis presentes. Para avaliar a influência dos parâmetros relacionados com a actividade da proteína, a suspensão bacteriana foi semeada em meio 7H9, meio 7H9 com Tween 80 e meio 7H9 com Brij 35. Seguidamente procedeu-se à contagem do número de colónias em meio 7H10. Os sistemas e as condições em estudo estão representados na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** – Diferentes condições em estudo. Cada amostra foi adicionada ao meio de cultura após inoculação.

Meio de Cultura	7H9 com 0.05% Tween 80	7H9 com 0.05% Brij 35	7H9
Amostras em estudo	nsLp	nsLp	nsLp
	LysB	LysB	LysB
	nsLp_LysB	nsLp_LysB	nsLp_LysB
	[nsLp_LysB]/2	[nsLp_LysB]/2	[nsLp_LysB]/2

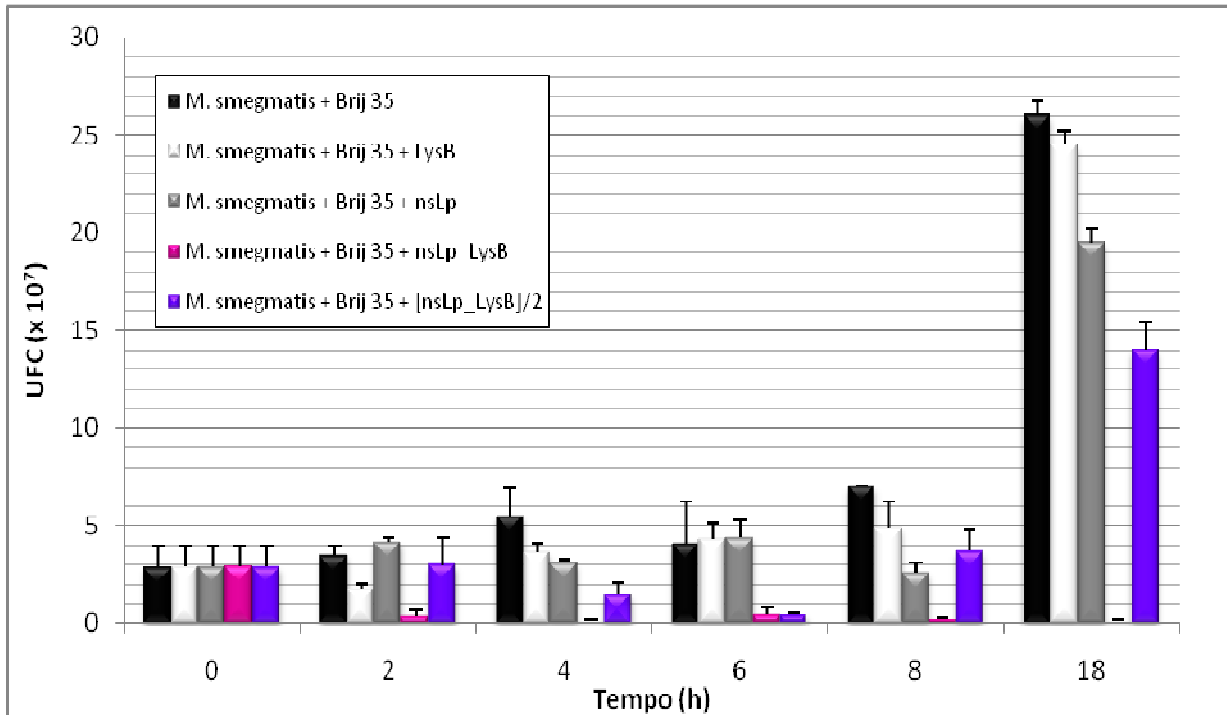
Os resultados observados após incubação de *M. smegmatis* com LysB, livre ou nanoincorporada, demonstram que a proteína LysB inibe o crescimento bacteriano de *M. smegmatis* na presença de Tween 80 (Figura 3.8).



**Figura 3.8** – Avaliação do efeito dos sistemas nsLp, LysB, nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2 em *M. smegmatis* por contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC), em meio 7H9 com adição de Tween 80.

Os resultados apresentados na figura 3.8 indicam que existe de facto uma inibição do crescimento bacteriano, na presença de Tween 80 que comprova os resultados obtidos apenas pela leitura da densidade óptica, ou seja, inibição da viabilidade celular para os sistemas estudados. Todavia, e contrariamente ao esperado o sistema nsLp\_LysB apresenta uma diminuição da sua eficácia a partir das 8h. No entanto este aumento no número de UFC ao fim das 18h pode não ser significativo, isto porque a leitura das 24h poderia revelar novamente uma diminuição se a situação for semelhante à obtida entre as 4 e as 6h do ensaio. A leitura das 24h não foi efectuada, no entanto seria importante para perceber, neste caso particular, se a inibição do crescimento bacteriano se mantinha ou apenas o sistema nsLp\_LysB seria eficaz durante um determinado período de acção.

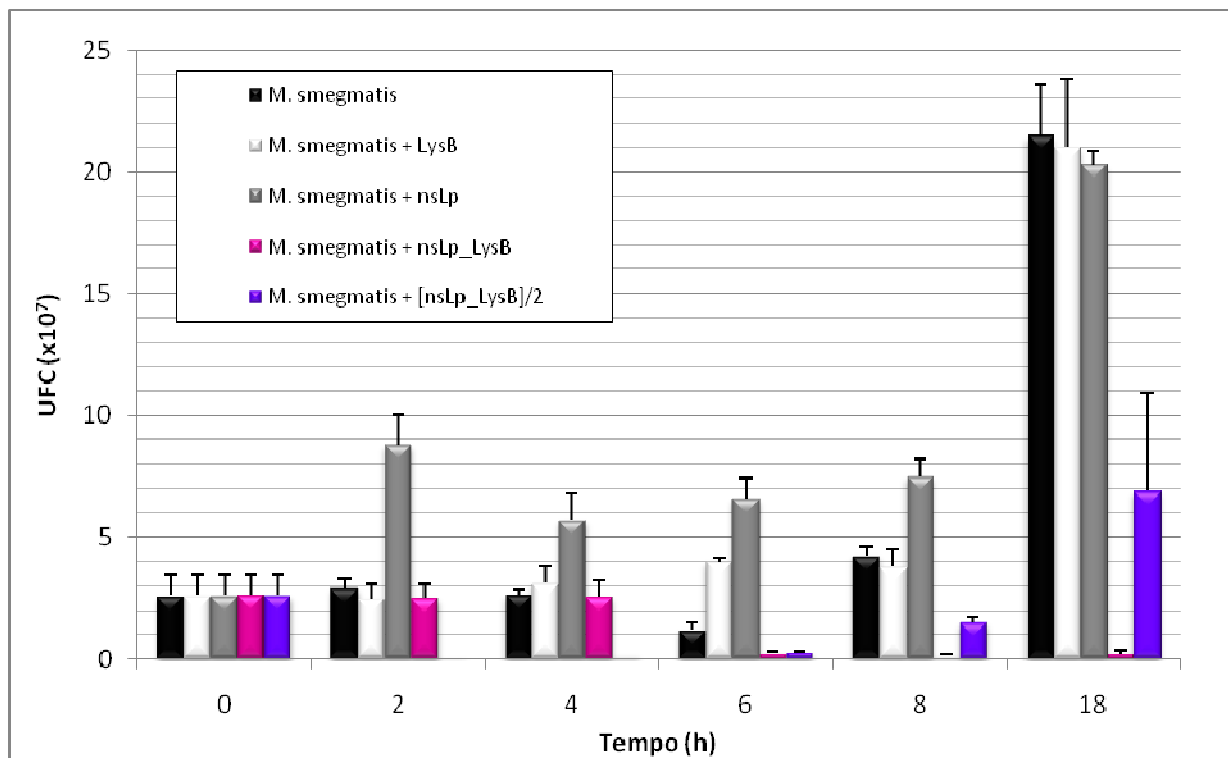
A avaliação do efeito da proteína LysB, livre ou nanoincorporada, sobre *M. smegmatis* em meio 7H9 suplementado com Brij 35 está representada na figura 3.9.



**Figura 3.9** – Avaliação do efeito dos sistemas nsLp, LysB, nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2 em *M. smegmatis* por contagem do número UFC, em meio 7H9 com adição de Brij 35.

Na figura 3.9 destaca-se a eficácia do sistema nsLp\_LysB, na sua função de transportador da proteína, facilitando a interação com a parede bacteriana, tal como observado por outros investigadores aquando da aplicação destas mesmas nanopartículas no transporte de outros fármacos <sup>(144)</sup>. O sistema [nsLp\_LysB]/2 foi também eficaz mas apenas durante as primeiras 6h do ensaio, uma vez que o número de UFC aumentou entre as 6h e as 8h e entre as 8h e as 18h. Pelo contrário, a proteína livre não produziu qualquer efeito apesar da presença de um tensioactivo, como o Brij 35, no meio de cultura, tal como já observado, no ensaio anterior, pela medição da densidade óptica.

A eficácia dos sistemas em estudo, sem adição de qualquer tipo detergente ao meio de cultura, foi também avaliada. A representação gráfica dos dados obtidos encontra-se na figura 3.10.



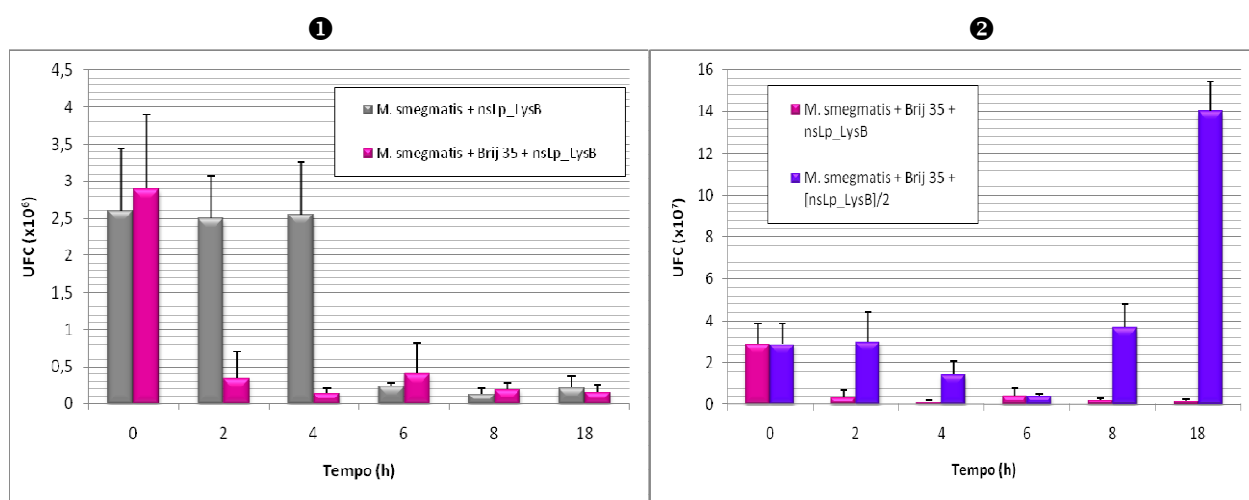
**Figura 3.10** – Avaliação do efeito dos sistemas nsLp, LysB, nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2 em *M. smegmatis* por contagem do número de UFC, em meio 7H9.

Os resultados demonstram que a proteína nanoincorporada é eficaz na ausência de tensoactivo.

O efeito da presença de nsLp\_LysB é, no entanto, mais tardio. A partir das 6h é nítido um efeito bactericida, tendo em conta a redução observada no número de UFC.

No sistema [nsLp\_LysB]/2, o efeito é observado apenas a partir das 2h. À semelhança do sistema anterior, observa-se um aumento do número de UFC decorridas 6h após o início do ensaio. Este facto pode estar relacionado com a concentração de LysB nanoincorporada.

Com base nos resultados obtidos para as três condições descritas anteriormente (presença de Brij 35, presença de Tween 80 e ausência de tensoactivo), elaboraram-se duas novas representações gráficas, com o objectivo de evidenciar especificamente duas situações distintas. A figura 3.11 ❶ representa a variação do número de UFC após a incubação do sistema nsLp\_LysB na presença e ausência do tensoactivo Brij 35. Por outro lado, a figura 3.11 ❷ ilustra a variação do número de UFC entre culturas incubadas com nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2, ambas na presença de Brij 35.



**Figura 3.11** – ❶ Variação das UFC de *M. smegmatis*, com a adição de nsLp\_LysB, ao longo do tempo do ensaio, na presença e ausência de Brij 35 no meio. ❷ Variação das UFC de *M. smegmatis*, pela adição de nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2 ao longo do tempo do ensaio, em meio 7H9 com adição de Brij 35.

A análise da figura 3.11 ❷ indica com detalhe a eficácia do sistema [nsLp\_LysB]/2 no que se refere à inibição da viabilidade celular do *M. smegmatis* em cultura. Todavia, e tal como referido anteriormente é visível uma eficácia apenas até às 6h após o início do ensaio, o que indica que este é um sistema menos reprodutível que o sistema nsLp\_LysB, que apresenta eficácia durante o período do ensaio.

Por outro lado, a análise da figura 3.11 ❶ sugere a importância da presença de detergente para a eficácia do sistema nsLp\_LysB, tal como referido anteriormente. De facto, na presença de Brij 35, a redução no número de UFC é visível ao fim de 2h do início do ensaio, enquanto que na ausência de detergente, o efeito apenas se observa ao fim de 6h.

Os resultados indicam que o sistema nsLp\_LysB representa uma terapêutica eficaz no que se refere à inibição do crescimento bacteriano de culturas de *M. smegmatis*.

Os sistemas de partículas podem ser utilizados de forma eficaz para o transporte de terapêuticas farmacológicas, incluindo moléculas activas, traduzindo-se na redução da dose administrada sem que exista uma redução da eficácia terapêutica, mas reduzindo comprovadamente a incidência de efeitos adversos <sup>(106)</sup>. De facto, existem vários estudos que aplicam os sistemas nanotransportadores no tratamento de infecções respiratórias, como a TB <sup>(3, 43, 76, 104, 107)</sup>, patologias tumorais <sup>(31, 145)</sup>, e até mesmo no tratamento de doenças metabólicas (diabetes) <sup>(130, 150)</sup>. Estes estudos reforçam o objectivo do presente trabalho, uma vez que a incorporação de fármacos/moléculas activas em nanopartículas promove a melhoria da biodisponibilidade dos mesmos e, conseqüentemente, alterações nas vias de entrada na célula, ou seja, na sua internalização celular.

### **3. 3.2. Estudo da actividade de nsLp\_LysB em linhas celulares de macrófagos.**

#### **A. Estudos de citotoxicidade**

##### **(i) Método de exclusão com azul de tripano**

De forma a inferir acerca da inocuidade dos compostos em estudo avaliou-se, pelo método de exclusão com azul de tripano, o efeito tóxico dos compostos e sistemas em estudo (nsLp, LysB, nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2) na viabilidade de culturas celulares de

---

macrófagos. Este método de coloração baseia-se no princípio de que células viáveis apresentam membranas intactas, e como tal evitam a penetração do corante, enquanto que as membranas metabolicamente inativas de células mortas não conseguem evitar a entrada do corante nas mesmas. A percentagem de células viáveis foi calculada com base na diferença entre o número de células total e o número de células mortas para uma determinada amostra celular. Deste modo, após 1h e 24h de contacto com os sistemas descritos, as células foram fixadas com paraformaldeído <sup>(93)</sup> e coradas com o azul de tripano. Os resultados relativos à viabilidade celular encontram-se resumidos na tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Resultados do ensaio de citotoxicidade dos sistemas em estudo.

	Células viáveis após 1h de contacto (%)	Células viáveis após 24h de contacto (%)
Macrófagos	100	100
Macrófagos + nsLp	99	99
Macrófagos + LysB	99	99
Macrófagos + nsLp_LysB	54	88
Macrófagos + [nsLp_LysB]/2	75	96

Os resultados indicam que a adição de nsLp e LysB a culturas de macrófagos não influencia a viabilidade celular da cultura de macrófagos. Resultados semelhantes foram anteriormente obtidos por Videira (2008), na avaliação da citotoxicidade de nsLp “*in vitro*” em culturas de macrófagos peritoneais de ratinho. Este estudo revelou que as nanopartículas não provocam diminuição da viabilidade celular, até concentrações de partículas oito vezes superiores ao número de células semeadas <sup>(144)</sup>.

Relativamente às nanopartículas com a proteína incorporada, os resultados demonstram a diminuição da viabilidade celular por adição dos sistemas nsLp\_LysB e [nsLp\_LysB]/2. Esta, no entanto, parece estar relacionada não tanto com a toxicidade do lípido e proteína que compõem o sistema, mas acima de tudo com a turvação do meio que poderá traduzir-se numa deficiente oxigenação da mesma. É possível que uma elevada concentração intracelular de nanopartículas, neste caso relacionada não apenas com o número de partículas, mas também com a internalização celular das nsLp, pode provocar uma acumulação de nanopartículas no citosol, com conseqüente aumento da actividade lipossomal e possível perda da viabilidade celular por saturação das vias endocíticas<sup>(144, 145)</sup>.

Por outro lado, em cultura de macrófagos, os produtos com origem na degradação das nsLp, que possam apresentar alguma toxicidade, estão durante períodos de tempo superiores em contacto com as células do que “*in vivo*”. Desta forma, e tal como descrito por Gelperina *et al* (2002) e Pereverzera *et al* (2007), espera-se uma toxicidade “*in vivo*” inferior à que se observa em cultura de macrófagos<sup>(56, 111)</sup>.

(ii) Citoquímica fluorescente para a actina

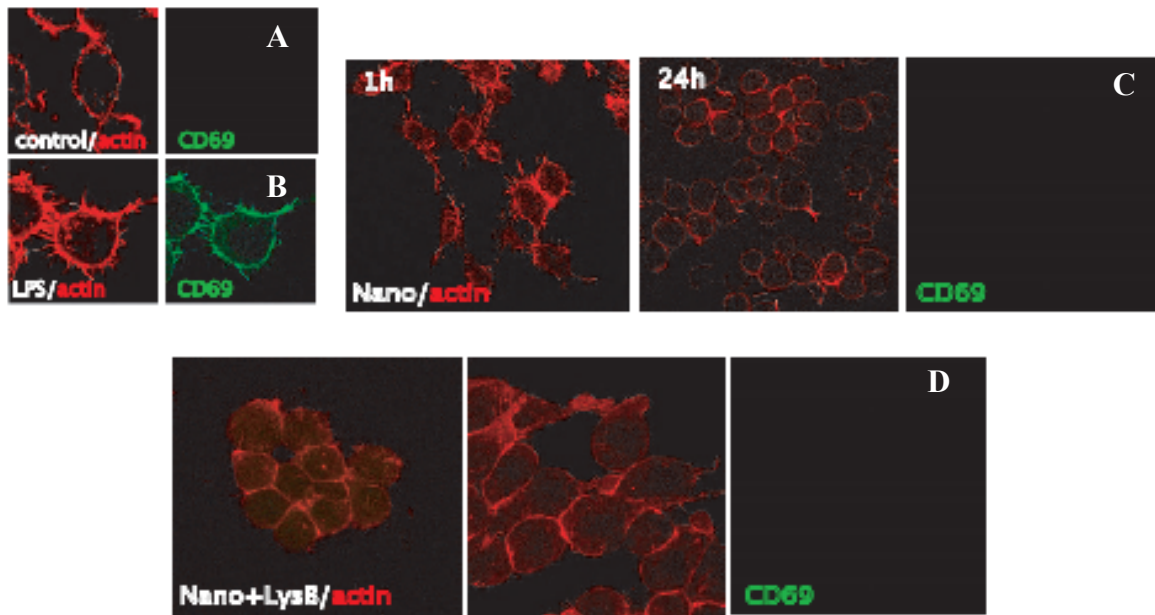
Com este ensaio pretendeu-se avaliar se os sistemas em estudo promoviam a activação dos macrófagos. Uma resposta imunológica ao contacto com os nossos sistemas seria indesejável, uma vez que o objectivo para estudos futuros será a administração do sistema nsLp\_LysB por inalação. Desta forma, marcou-se o citosqueleto de actina por coloração com rodamina-faloidina (coloração vermelha). Este composto tem sido utilizado para a marcação celular do citosqueleto de actina com o objectivo de avaliar se existe activação celular, por contacto com compostos que promovam a resposta imunitária das células e a activação de

---

receptores à superfície das mesmas. Num processo de activação celular, surgem à superfície dos macrófagos activados receptores CD69 (glicoproteína de superfície), que funcionam como um transmissor de sinal de receptor para activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B, (factor nuclear kappa-light-chain-potenciador de células activadas B) proteína complexa que controla a transcrição do ADN e que está presente na maioria das células animais, promovendo a activação de linfócitos nk e plaquetas. Este factor está ainda envolvido na resposta celular a diferentes estímulos como stress, citocinas, radicais livres, antigénios virais ou bacterianos <sup>(15, 49)</sup>.

No presente ensaio após coloração e tratamento com um anticorpo anti-CD69 não se observou a activação dos macrófagos, o que sugere que o contacto com os sistemas em estudo não promove a estimulação dos macrófagos em cultura e, conseqüentemente, os resultados futuramente obtidos em macrófagos infectados com *M. smegmatis* apenas estarão relacionados com a actividade dos nossos sistemas sobre as micobactérias.

A figura 3.13 C e D ilustra as observações microscópicas obtidas após 1h e 24h de contacto com as nsLp vazias e com o sistema nsLp\_LysB, respectivamente.



**Figura 3.13** – Imagens obtidas ao microscópio de fluorescência por coloração, do citoesqueleto de actina de macrófagos, com rodamina-faloidina após 1h e 24h de contacto com os sistemas nsLp\_LysB (D), nsLp vazias (C). A figura 3.13 A representa o controlo negativo e a figura 3.13 B o controlo positivo por marcação do indução da activação com LPS de *E. coli*.

Os resultados foram analisados por comparação com os dois grupos controlo: cultura de macrófagos não activados (controlo negativo) e cultura de macrófagos activados (controlo positivo). O controlo positivo (figura 3.13 B) foi obtido após estimulação dos macrófagos com LPS de *E. coli*. O lipopolissacárido (LPS) é uma endotoxina bacteriana que promove uma resposta imunitária, após o contacto com células do sistema imunitário. A adição de LPS a uma cultura de macrófagos origina o aparecimento de receptores CD69 à superfície das células (140). Deste modo a adição do anticorpo anti-CD69 ao meio, promove o aparecimento de fluorescência (verde) ao nível da membrana plasmática, visível na figura 3.13, e que indica uma estimulação das células em cultura. Por outro lado, o controlo de macrófagos após adição do anticorpo não apresenta a coloração referida (figura 3.13 A).

De igual modo, ausência de fluorescência sugere que não existe activação dos macrófagos em cultura pelo contacto com nsLp e nsLp\_LysB, uma vez que, contrariamente

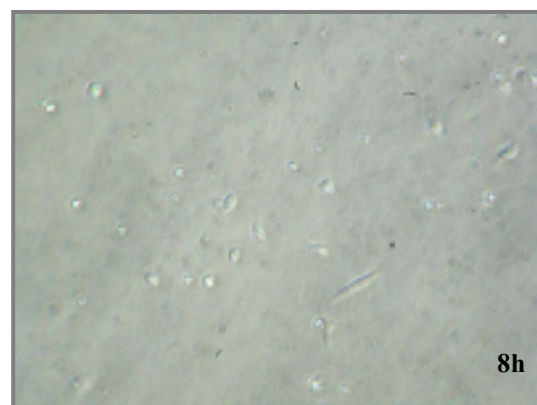
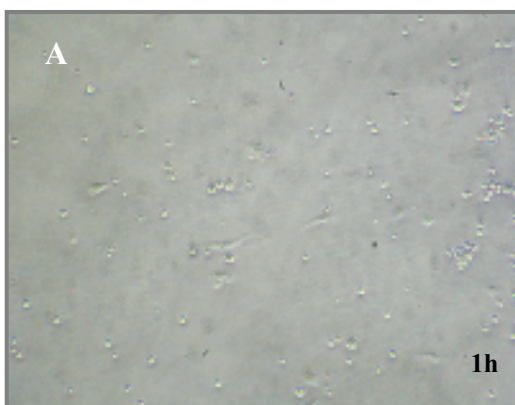
ao controlo positivo, os resultados demonstram a negatividade do anticorpo anti-CD69, como se pode observar na figura 3.13 C e D.

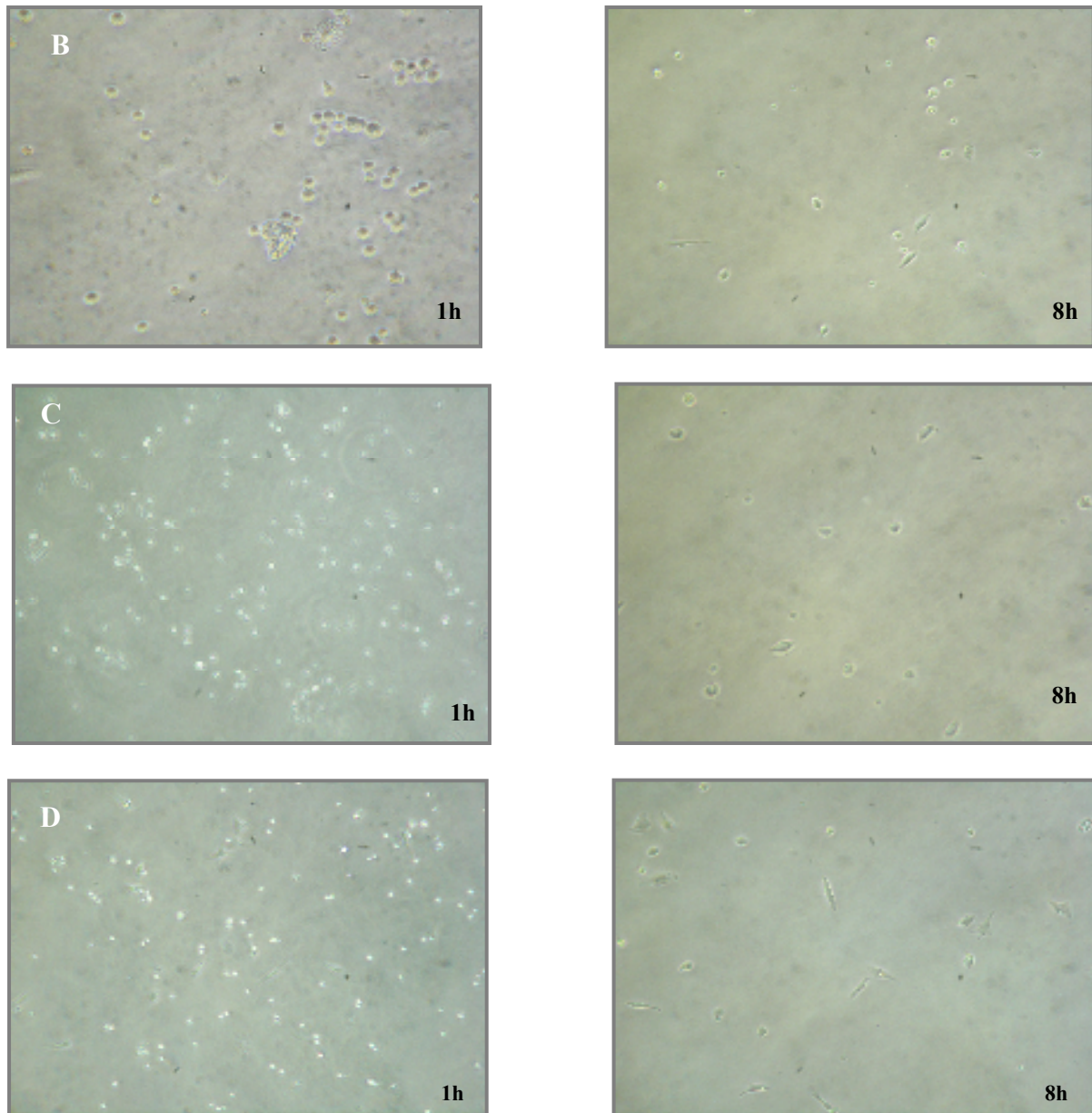
De acordo com os resultados obtidos, e sabendo que não existe activação celular, nem redução de viabilidade, dos macrófagos em cultura por contacto com o sistema nsLp\_LysB, prosseguiu-se com os estudos de eficácia terapêutica em macrófagos infectados com *M. smegmatis*, com o objectivo de avaliar o efeito da internalização do sistema nsLp\_LysB na multiplicação e sobrevivência de *M. smegmatis* intracelular.

#### B. Estudo da actividade Biológica de nsLp\_LysB em macrófagos peritoneais infectados com *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

A sobrevivência de *M. smegmatis* após internalização do sistema nsLp\_LysB, LysB e nsLp foi avaliada utilizando para o efeito uma linha celular de macrófagos peritoneais de ratinho.

Os resultados obtidos, relativos à inibição do crescimento bacteriano, são preliminares, não permitindo a sua análise estatística. Contudo, este estudo revelou-se importante para a caracterização morfológica das células fagocitárias quando sujeitas ao tratamento com nsLp\_LysB, LysB livre e nsLp vazias. A figura 3.14 ilustra os resultados obtidos.





**Figura 3.14** - Fotografias de microscópio óptico obtidas a diferentes ampliações. (A) Aspecto morfológico das culturas de macrófagos peritoneais após 1 e 8h de infecção com *M. smegmatis*. (B) Aspecto morfológico dos macrófagos peritoneais infectados por *M. smegmatis*, decorridas 1 e 8h desde o início do ensaio. Imagem obtida após contacto com as nsLp. (C) Aspecto morfológico dos macrófagos peritoneais infectados por *M. smegmatis*, decorridas 1 e 8h desde o início do ensaio. Imagem obtida após contacto com o sistema nsLp\_LysB. (D) Aspecto morfológico dos macrófagos peritoneais infectados por *M. smegmatis*, decorridas 1 e 8h desde o início do ensaio. Imagem obtida após contacto com a proteína livre (LysB). Para todas as culturas macrofágicas presentes no ensaio, excepto para o grupo controlo, promoveu-se, após a infecção, um contacto de 1h com os sistemas em estudo.

A análise microscópica indica uma recuperação celular significativa após um período crítico inicial, resultante do contacto com todos os sistemas em estudo. De facto, após 8h do início do ensaio, as células fagocitárias, tratadas com as nsLp e com o sistema nsLp\_LysB, apresentam uma taxa de crescimento estabilizado, normal, o que sugere que estes sistemas são rapidamente internalizados pelos macrófagos (Figura 3.14 A, B, C), sugerindo o envolvimento das vias endocíticas, embora o mecanismo subjacente a este fenómeno continue por esclarecer <sup>(144)</sup>. O sistema nsLp\_LysB apresenta uma elevada potencialidade para o tratamento de infecções intracelulares porque, de acordo com estudos anteriores, as nsLp são partículas endocitáveis que permitem o transporte de fármacos directamente a uma célula específica <sup>(144)</sup>.

A análise morfológica das células, após adição isolada de LysB, sugere uma estimulação celular. De facto, os macrófagos comportam-se como células apresentadoras de antigénio quando submetidas à acção da LysB, uma vez que adquirem uma morfologia distinta das restantes, como se pode observar na figura 3.14 D.

A actividade biológica de proteínas após nebulização está comprometida, essencialmente, por fenómenos de imunogenicidade e de instabilidade química relacionados com as proteínas administradas <sup>(24)</sup>. É de salientar a importância da presença do nanotransportador, uma vez que a administração pulmonar de proteínas livres pode desencadear uma resposta imunológica indesejada. Byron *et al* (1990), Bukowski *et al* (2002), Thanoo *et al* (1992) propuseram que a aplicação de sistemas transportadores nanométricos constitui uma solução para melhorar a estabilidade das proteínas administradas <sup>(22, 24, 137)</sup>. Num estudo recente, Bukowski *et al* (2002) já havia demonstrado que a utilização de um complexo PEG-proteína reduz eficazmente a resposta imunogénica após inalação <sup>(22)</sup>.

---

No presente estudo, a análise microscópica demonstra que a incubação com nsLp não produz qualquer efeito de estimulação nos macrófagos peritoneais, sugerindo um processo normal de fagocitose. Este facto está de acordo com o anteriormente observado no ensaio com o corante rodamina-faloidina, onde não é visível a estimulação dos macrófagos em cultura por adição das nsLp e do sistema nsLp\_LysB.

Os resultados obtidos, embora preliminares reforçam o nosso objectivo, uma vez que a proteína nanoincorporada não promove uma activação dos macrófagos em cultura. A activação de proteínas de membrana seria importante numa perspectiva de vacinação.

A incorporação de proteínas em sistemas nanotransportadores para administração pulmonar representa uma alternativa promissora à terapêutica injectável ou oral de proteínas e péptidos, por ser uma via não invasiva, aumentando também a adesão do doente ao tratamento <sup>(116)</sup>.

Em concordância com os autores referidos anteriormente, é possível afirmar que a administração pulmonar de um nanotransportador poderá constituir a melhor opção para a aplicação clínica da LysB.

De facto, a terapêutica baseada na vectorização celular, na qual um transportador conduziria os fármacos às células-alvo, os macrófagos alveolares, sendo por estas internalizado utilizando os seus mecanismos celulares, tem sido destacada. Estes mecanismos foram descritos por Yoshida *et al* (2006) que utilizando rifampicina incorporada em microesferas observaram um aumento da concentração intracelular do fármaco em macrófagos alveolares comparativamente ao fármaco livre, tendo os autores relacionado o transporte intracelular de nanotransportadores com os mecanismos de fagocitose <sup>(154)</sup>. No entanto, estes mecanismos de fagocitose estão dependentes do diâmetro médio e da hidrofobicidade do transportador <sup>(154)</sup>.

---

Um sistema como as nsLp preenche os requisitos necessários a um transportador eficaz, dadas as suas características de hidrofobicidade e diâmetro médio. De facto, o *target* intracelular pode ser antecipado tendo em conta o carácter endocitável das nsLp, tal como foi descrito por Videira, (2008) <sup>(144)</sup>.

Mais ainda, a aplicação de nanopartículas como transportadores de fármacos mostrou ser eficaz não só para a administração pulmonar de fármacos, mas também para a administração oral de fármacos e biomoléculas activas. De facto, Sarmiento *et al* (2007) desenvolveu um sistema de nanopartículas para o transporte de péptidos após administração oral. Os autores incorporaram insulina num transportador lipídico, com o objectivo de, através do mesmo, controlar a sua libertação. A análise dos resultados demonstra que a redução no valor da glicémia foi mais significativa no grupo tratado com a insulina nanoincorporada <sup>(123)</sup>. Deste modo, é possível concluir que as SLN protegem a Insulina da degradação enzimática no tracto gastrointestinal, promovendo a sua absorção intestinal, que de um modo geral se encontra comprometida, uma vez que se trata de uma proteína de elevado peso molecular <sup>(123)</sup>.

### C. Actividade do sistema nsLp\_LysB em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

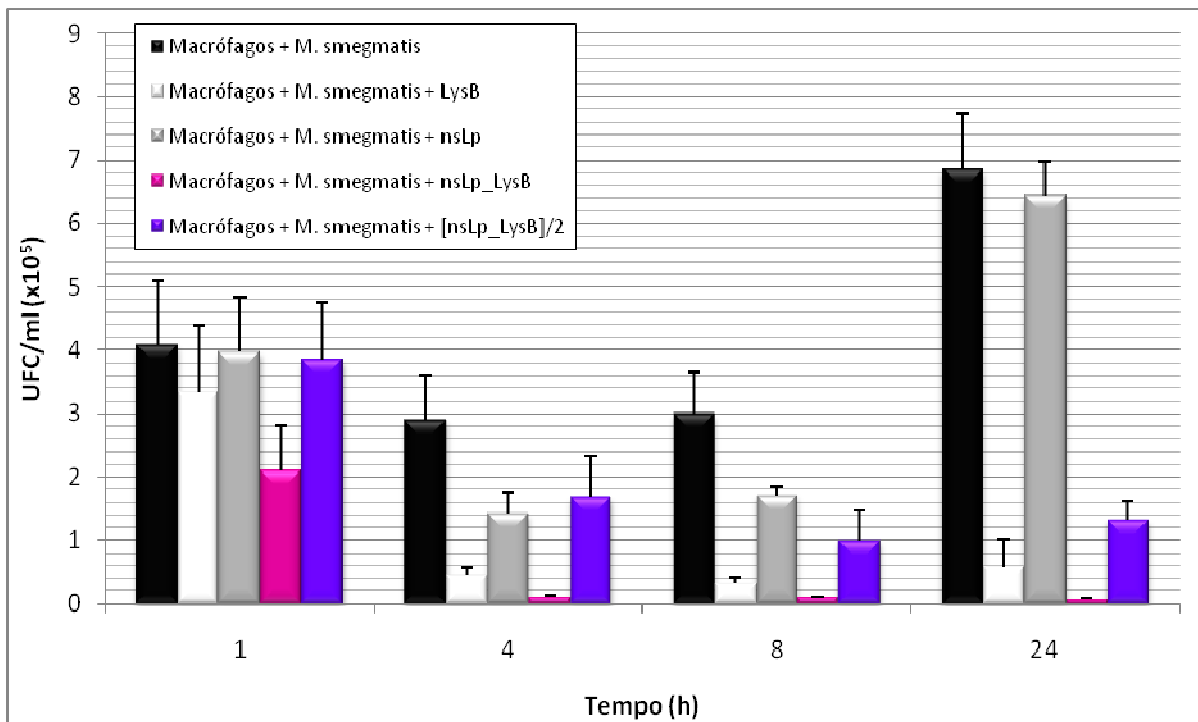
O efeito antimicrobiano do sistema nsLp\_LysB sobre a morte celular de *M. smegmatis* em macrófagos de ratinho da linha celular J774A.1 infectados com *M. smegmatis* foi avaliado e comparado com o controlo da proteína livre (LysB) e das nsLp vazias. Para este estudo, desenharam-se dois protocolos experimentais, nos quais se variou o momento da infecção.

- **Ensaio 01:** infecção dos macrófagos com *M. smegmatis* e posterior internalização dos sistemas em estudo;

- **Ensaio 02:** internalização dos sistemas em estudo seguida de infecção dos macrófagos com *M. smegmatis*.

Em qualquer dos ensaios, a sobrevivência das micobactérias foi avaliada após a lise celular e contagem das UFC de *M. smegmatis*.

Os resultados do ensaio 01 estão resumidos na figura 3.15, na qual se pode observar a diminuição do valor de UFC em todos os grupos em estudo, após as 24h de ensaio, com exceção dos controlos de macrófagos infectados por *M. smegmatis* e de macrófagos infectados por *M. smegmatis* e incubados com as nsLp vazias.



**Figura 3.15** – Gráfico com a variação do valor de UFC de bactérias extraídas das células lisadas para cada intervalo de tempo em estudo.

Apesar da eficácia da LysB se observar em ambos os sistemas em estudo, é claramente visível um menor efeito de LysB quando livre, comparativamente à apresentada no

transportador lipídico. De facto, a proteína nanoincorporada revelou uma actividade cerca de oito vezes superior à observada para a proteína livre, traduzida por uma redução do número de UFC/ml. Este facto, evidência, antes de mais, uma elevada biodisponibilidade intracelular, que justifica por si só a maior eficácia terapêutica. Este efeito mais pronunciado no caso das nsLp\_LysB, para concentrações extracelulares equivalentes de LysB, sugere que podemos estar perante uma menor permeabilidade celular à proteína livre, existindo uma maior eficácia terapêutica do sistema nsLp\_LysB. Tal como havia sido descrito por Yoshida (2006) e Pandey (2006), a eficácia terapêutica é dez vezes superior para o fármaco nanoincorporado (105, 154).

Uma maior acumulação de fármaco nanoincorporado em macrófagos ficou demonstrada pelos estudos de Kisich *et al* (2007), não tendo esta acumulação, no entanto, correspondido a um aumento da eficácia terapêutica. Os autores referem que o fármaco nanoincorporado atinge uma concentração intracelular cerca de três vezes superior à obtida para o fármaco livre <sup>(77)</sup>. Desta forma, a utilização de nsLp representa uma mais-valia, o que está de acordo com os resultados anteriormente obtidos por Videira (2008) <sup>(144)</sup>.

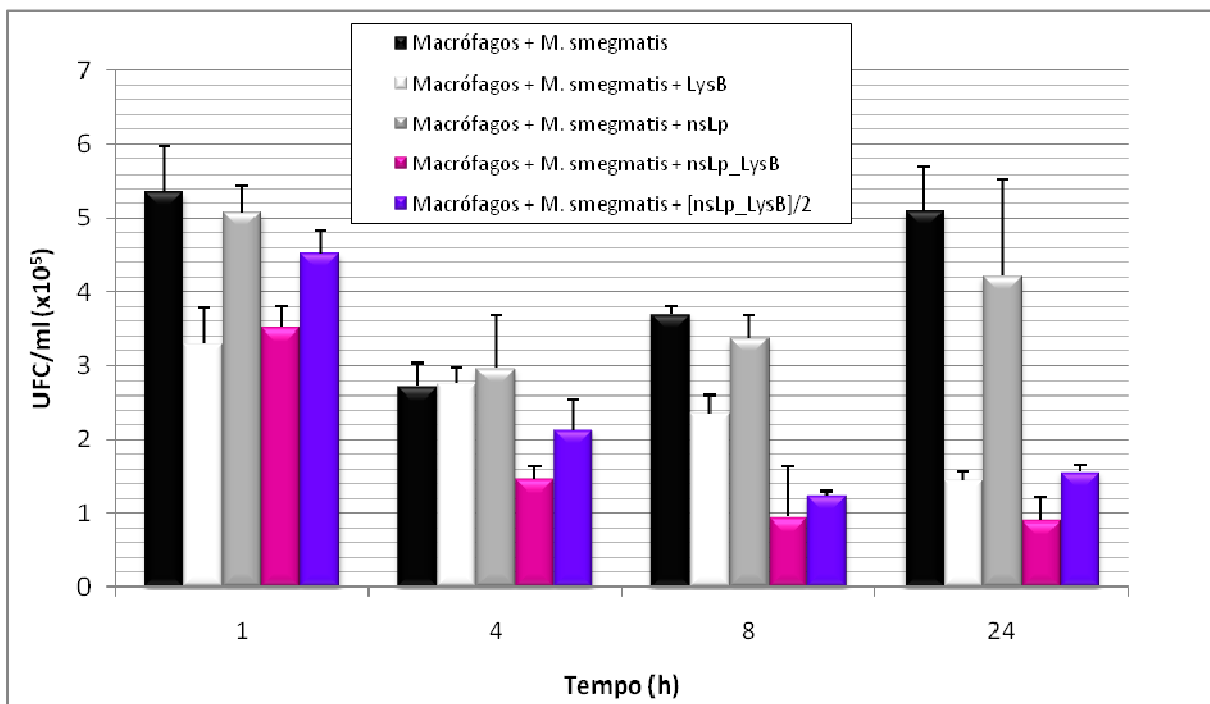
Tendo em conta que a maioria dos autores refere o bloqueio das vias lisossomais dos macrófagos, fomos verificar se este factor inibe de algum modo a endocitose do sistema nsLp\_LysB. Assim, com o objectivo de avaliar se os macrófagos infectados teriam algum efeito redutor na internalização do sistema nsLp\_LysB, realizou-se o ensaio 02, no qual se adicionou as nanopartículas a uma cultura de macrófagos e só posteriormente se procedeu à infecção com *M. smegmatis*.

Os resultados representados na figura 3.16 confirmam a existência de uma actividade sobre *M. smegmatis*, apresentando no entanto um menor efeito que no ensaio anterior, sugerindo que não há redução da capacidade de fagocitose dos macrófagos infectados.

---

Adicionalmente, observou-se também uma redução do número de UFC, tal como observado no ensaio 1.

Relativamente ao ensaio 02, os dados confirmam que, à semelhança do ensaio anterior, o aumento da carga bacteriana é visível nos grupos controlo de macrófagos infectados por *M. smegmatis* e macrófagos infectados por *M. smegmatis* e incubado com as nanopartículas lipídicas vazias (figura 3.16).



**Figura 3.16** – Gráfico com a variação do valor de UFC de bactérias extraídas de células lisadas para cada intervalo de tempo em estudo.

Os dados obtidos demonstram a mesma tendência de diminuição da carga bacteriana na presença da proteína LysB, livre ou nanoincorporada. Uma vez mais o efeito é superior para o sistema nsLp\_LysB, cerca de duas vezes superior ao apresentado pela LysB livre. Relativamente ao ensaio 01, no ensaio 02 observou-se uma menor redução da carga

bacteriana. É interessante verificar que o contacto prévio com a associação nsLp\_LysB em estudo reduz, igualmente, a carga bacilar dos macrófagos infectados.

De facto, a utilização de nsLp\_LysB como sistema terapêutico, ou seja após a infecção, desencadeia uma resposta mais eficaz, quando comparado com a sua utilização prévia à infecção, onde se obtiveram respostas ligeiramente inferiores. É interessante verificar que, aparentemente, não se observa uma saturação das vias endocíticas pela internalização e digestão do sistema nsLp\_LysB e consequente libertação da proteína no citosol.

A eficácia do sistema transportador ficou demonstrada nos dois protocolos através da magnitude da resposta terapêutica. Contudo, a resposta parece estar dependente do esquema de tratamento implementado.

O aumento da resposta bacteriana à LysB, incorporada nas nanopartículas, pode estar directamente relacionado com o mecanismo de internalização do sistema transportador. A relação da natureza lipídica do transportador com a elevada eficácia “*in vitro*” já tenha sido demonstrada anteriormente <sup>(154)</sup>.

### **3.4. Estudo da actividade biológica do sistema nsLp\_LysB em culturas de *M. tuberculosis*.**

Com este ensaio pretendia observar-se o efeito das nsLp vazias e do sistema nsLp\_LysB em uma estirpe clínica de *M. tuberculosis*. As amostras foram analisadas em sistema BACTEC MGIT 960, aparelho automatizado que se caracteriza por uma maior capacidade e rapidez de resposta. Este efectua para além da detecção do crescimento das micobactérias, os testes de sensibilidade. O BACTEC MGIT 960 é um sistema não radiométrico, totalmente automatizado, que explora a fluorescência de um sensor de oxigénio

---

para a detecção do crescimento de micobactérias em cultura, por uma determinação precisa do consumo de oxigénio <sup>(5, 139)</sup>.

Após 7 dias do início do ensaio observou-se uma floculação no meio de cultura onde se incubou o sistema nsLp\_LysB. Apesar deste fenómeno, manteve-se a incubação até ao final do ensaio. De facto, decorridos 30 dias desde a incubação, em triplicado, de uma cultura virulenta de *M. tuberculosis* com o sistema nsLp\_LysB e com as nsLp vazias observou-se uma inibição do crescimento bacteriano para o sistema nsLp\_LysB, mantendo o tubo com as nsLp vazias o seu crescimento normal.

Embora os resultados sejam preliminares, uma vez que se realizou apenas um ensaio, este demonstrou a importância do sistema terapêutico em estudo na inibição do crescimento bacteriano de uma estirpe clínica virulenta, o que sugere que este poderá representar um bom sistema para o transporte de biomoléculas usadas no tratamento de infecções bacterianas por *M. tuberculosis*.

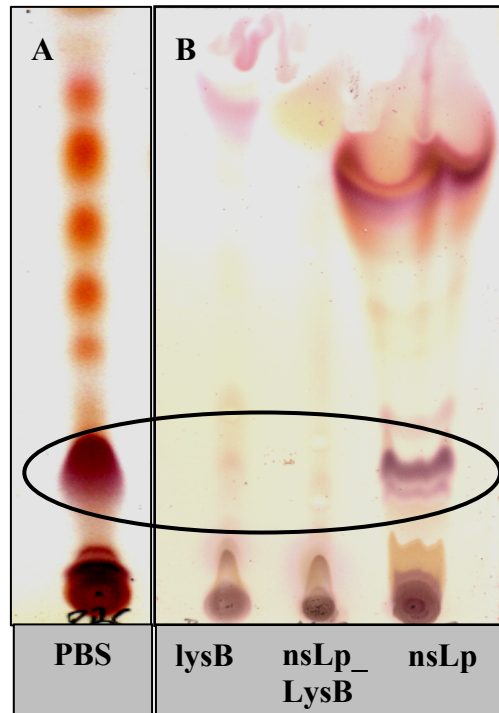
### **3.5. Extracção de Lípidos Totais das micobactérias**

Tal como já referido, a parede das micobactérias, ao contrário de outras bactérias Gram-positivas apresenta, na sua constituição, uma elevada percentagem de lípidos <sup>(17)</sup>. Estudos recentes classificaram a LysB como uma proteína com actividade lipolítica, revelando uma capacidade para hidrolisar substratos de cadeia curta (esterases) e de cadeia longa (lipases) <sup>(57)</sup>. A actividade de LysB em extractos lipídicos de micobactérias foi já demonstrada <sup>(57, 58)</sup>.

Com o objectivo de avaliar a capacidade do sistema nsLp\_LysB em actuar sobre extractos lipídicos de *M. smegmatis*, testou-se a sua actividade, no seu substrato natural, mais especificamente, na fracção lipídica extraída da parede micobacteriana. Deste modo, os

---

lípidos totais de *M. smegmatis* foram extraídos e tratados com a proteína LysB livre e adsorvida às nsLp durante 24h a 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram aplicadas numa placa de TLC e desenvolvidas num sistema solvente apropriado (Clorofórmio:Metanol:Água) (Figura 3.17).



**Figura 3.17** – Placa de TLC obtida após a eluição com o solvente (Clorofórmio:Metanol:Água). A) Controlo. Neste, os lípidos totais de *M. smegmatis* foram apenas tratados com PBS; B) representa análise dos lípidos totais de *M. smegmatis* após o tratamento dos mesmos com o sistema nsLp\_LysB, com as nsLp vazias e com a proteína LysB livre.

A observação da placa de TLC obtida indica a presença de diferenças entre o perfil das amostras tratadas com LysB e nsLp\_LysB e o perfil das amostras tratadas com as nsLp vazias e apenas com PBS (controlo). Como se pode observar na figura, nas amostras tratadas quer com a proteína livre, quer com o sistema nsLp\_LysB ocorre o desaparecimento da banda assinalada, presente no controlo (Coluna A) e na amostra tratada apenas com as nsLp. Por

outro lado, são visíveis as semelhanças entre o perfil da amostra tratada com LysB e com nsLp\_LysB. A coluna A representa o controlo, que corresponde ao extracto lipídico não tratado. Na coluna B estão representados os extractos lipídicos após o tratamento com a LysB livre, o sistema nsLp\_LysB e as nsLp vazias. Os resultados obtidos confirmam a capacidade de actuação desta proteína sobre os substratos lipídicos. Gil (2008) já havia demonstrado que a LysB é capaz de actuar não só na fracção lipídica de *M. smegmatis* mas também em *M. tuberculosis* H37Ra e *M. bovis* BCG, concluindo que o substrato da LysB é um lípido da parede celular, comum a todas as micobactérias <sup>(57, 58)</sup>.

# Capítulo 4. Conclusão e Perspectivas Futuras

Apesar da variedade de esquemas terapêuticos e da crescente investigação clínica, na área da infecciologia, mais especificamente no que respeita à TB, os agentes antibacterianos disponíveis para aplicação terapêutica apresentam limitações que abrangem tanto a sua toxicidade sistémica, como o desenvolvimento de resistências que impedem a resolução clínica da doença. A metabolização hepática destes fármacos e a ocorrência de efeitos adversos decorrentes da sua utilização continuam a ser um factor determinante para a necessidade de desenvolver soluções tecnológicas inovadoras.

O presente trabalho consistiu na produção de um sistema constituído por um nanotransportador lipídico e uma proteína fágica (nsLp\_LysB), na sua análise e avaliação da sua actividade antimicrobiana em culturas de *M. smegmatis* e em macrófagos infectados pelo mesmo agente bacteriano.

As nanopartículas desenvolvidas de acordo com o método criado por Videira, em 2008, demonstraram novamente que representam um sistema de partículas promissor, abrindo novas perspectivas para a sua utilização em terapêuticas selectivas.

Com este trabalho, e à semelhança de estudos anteriores elaborados por outros autores, demonstrou-se também a eficácia da proteína LysB na inibição do crescimento bacteriano de culturas de *M. smegmatis* em fase exponencial de crescimento. Mais ainda, concluiu-se que a utilização de um sistema transportador representa uma mais-valia para a aplicação terapêutica

---

desta proteína, uma vez que lhe confere algumas características importantes e permite manter ou melhorar o seu desempenho enquanto biomolécula activa. A incorporação em nanopartículas lipídicas pode representar uma estratégia interessante para alterar, não apenas a farmacocinética, como também a biodistribuição de fármacos.

Deste modo, a aplicação de nanopartículas como transportadores de moléculas activas e fármacos poderá ser a chave para o sucesso terapêutico, em todas as fases evolutivas da patologia, uma vez que promove a veiculação da molécula/fármaco ao seu local de acção, reduzindo possíveis efeitos adversos, metabolização com perda de eficácia dos mesmos e uma maior adesão por diminuição do número de tomas diárias.

Foi também possível concluir que a aplicação deste sistema nsLp\_LysB é eficaz na redução da carga bacilar de macrófagos infectados por *M. smegmatis*. Este facto é particularmente importante, uma vez que permite a passagem dos estudos de culturas celulares para estudos onde um novo interveniente (macrófagos) poderia alterar a resposta observada para as culturas de *M. smegmatis*. De facto, em macrófagos infectados previamente por este agente bacteriano, a diminuição do número de UFC é notória e indica que este é um sistema eficaz.

A alteração do perfil lipídico de *M. smegmatis* após o tratamento com LysB já tinha sido anteriormente descrita. Este estudo vem também reforçar esta ideia, uma vez que não só ocorre alteração do perfil lipídico nas amostras tratadas com a proteína livre como também as amostras tratadas com o sistema nsLp\_LysB apresentam um perfil distinto do controlo e semelhante ao obtido para a LysB isolada. Assim a hipótese levantada pelos investigadores de que a actuação desta proteína está associada à camada lipídica da parede das micobactérias é com esta nova aplicação reforçada. Em estudos futuros será interessante verificar se os resultados obtidos com o sistema nsLp\_LysB são semelhantes ao da proteína livre para

---

estirpes seleccionadas Deste modo será interessante executar novos estudos em que este sistema seja aplicado sobre os lípidos da parede de outras micobactérias, incluindo os lípidos da parede de *M. tuberculosis*.

Os conceitos da nanomedicina oferecem novas estratégias que se têm revelado importantes para a área da farmacoterapia. Um elevado número de compostos bioactivos pode ser adsorvido com os nanotransportadores permitindo, num futuro próximo, o tratamento da maioria das infecções e patologias respiratórias, incluindo a TB. Por outro lado, os efeitos adversos podem ser reduzidos aumentando a concentração dos fármacos apenas no órgão alvo. O potencial de um transportador coloidal, está relacionado com a organização da matriz que o constitui e com a capacidade deste em não ser reconhecido pelo sistema imunológico, atingir selectivamente a região lesada, estar disponível durante um período de tempo adequado, libertar no tempo uma concentração terapêutica de fármaco, alterar o índice terapêutico dos fármacos a ele associados, e proteger o fármaco da degradação enzimática.

Este trabalho sugere que a utilização de um sistema transportador permite a administração de biomoléculas, incluindo ADN, ARN, péptidos e proteínas. Isto porque as características próprias destas nanopartículas protegem-nas da degradação enzimática, permitindo deste modo a sua administração por vias de administração, impossíveis quando se considera a molécula livre.

Com base nas características deste sistema nsLp\_LysB e no ensaio onde se promoveu primeiramente o contacto dos macrófagos com os compostos e só depois a sua infecção com *M. smegmatis*, é interessante verificar que o contacto prévio com a associação nsLp\_LysB em estudo parece reduzir a carga bacilar destas células fagocíticas.

A encapsulação de agentes antibacilares para terapêutica da TB em vectores coloidais é uma das formas propostas para prolongar a sua eficácia, concentrar o fármaco no local de

---

acção e diminuir, nomeadamente nos órgãos saudáveis, a toxicidade característica destes agentes. Deste modo, estudos futuros deveriam incidir sobre o sistema nsLp\_LysB com o objectivo de avaliar a inibição do seu crescimento em culturas clínicas virulentas, bem como a sua eficácia na redução da carga bacilar de macrófagos infectados pelas mesmas.

Deste modo será interessante executar novos estudos em que este sistema seja aplicado sobre os lípidos da parede de outras micobactérias, incluindo os lípidos da parede de estirpes de *M. tuberculosis*.

## Bibliografia

1. 2009. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR TB). Centers for Disease Control and Prevention.
2. 2009. Plan to Combat Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Recommendations of the Federal Tuberculosis Task Force. Centers for Disease Control and Prevention.
3. **Ahmad, Z., R. Pandey, S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2008. Novel chemotherapy for tuberculosis: chemotherapeutic potential of econazole- and moxifloxacin-loaded PLG nanoparticles. *Int J Antimicrob Agents* **31**:142-6.
4. **Ahmad, Z., R. Pandey, S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int J Antimicrob Agents* **27**:409-16.
5. **Alcaide, F., M. A. Benitez, J. M. Escriba, and R. Martin.** 2000. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* **38**:398-401.
6. **Alcaide, F., N. Gali, J. Dominguez, P. Berlanga, S. Blanco, P. Orus, and R. Martin.** 2003. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* **41**:2867-71.
7. **Alisky, J., K. Iczkowski, A. Rapoport, and N. Troitsky.** 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect* **36**:5-15.

8. **Arnadottir, T.** 2001. Tuberculosis: trends and the twenty-first century. *Scand J Infect Dis* **33**:563-7.
9. **Azarmi, S., W. H. Roa, and R. Lobenberg.** 2008. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv Drug Deliv Rev* **60**:863-75.
10. **Balland, O., H. Pinto-Alphandary, A. Viron, E. Puvion, A. Andremont, and P. Couvreur.** 1996. Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H)ampicillin-loaded nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* **37**:105-15.
11. **Bar, H., I. Yacoby, and I. Benhar.** 2008. Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC Biotechnol* **8**:37.
12. **Batyrbekov, E. O., Rukhina, L. B., Zhubanov, B. A.** 1997. Drug Delivery systems for Tuberculosis treatment. *Polym Int* **43**:317-320.
13. **Bawarski, W. E., E. Chidlow, D. J. Bharali, and S. A. Mousa.** 2008. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine* **4**:273-82.
14. **Bender, A. R., H. von Briesen, J. Kreuter, I. B. Duncan, and H. Rubsamen-Waigmann.** 1996. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1467-71.
15. **Borrego, F., M. J. Robertson, J. Ritz, J. Pena, and R. Solana.** 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**:159-65.
16. **Brain, J. D., and P. A. Valberg.** 1979. Deposition of aerosol in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* **120**:1325-73.

17. **Brennan, P. J.** 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **83**:91-7.
18. **Brennan, P. J., and H. Nikaido.** 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**:29-63.
19. **Briones, E., C. I. Colino, and J. M. Lanao.** 2008. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release* **125**:210-27.
20. **Broxmeyer, L.** 2004. Bacteriophages: antibacterials with a future? *Med Hypotheses* **62**:889-93.
21. **Brussow, H., and R. W. Hendrix.** 2002. Phage genomics: small is beautiful. *Cell* **108**:13-6.
22. **Bukowski, R. M., C. Tendler, D. Cutler, E. Rose, M. M. Laughlin, and P. Statkevich.** 2002. Treating cancer with PEG Intron: pharmacokinetic profile and dosing guidelines for an improved interferon-alpha-2b formulation. *Cancer* **95**:389-96.
23. **Bull, J. J., B. R. Levin, T. DeRouin, N. Walker, and C. A. Bloch.** 2002. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC Microbiol* **2**:35.
24. **Byron, P. R.** 1990. Determinants of drug and polypeptide bio-availability from aerosols delivered to the lung. *Adv Drug Deliv Rev* **5**:107-132.
25. **Caminero, J. A.** 2005. Management of multidrug-resistant tuberculosis and patients in retreatment. *Eur Respir J* **25**:928-36.
26. **Chang, D. K., C. T. Lin, C. H. Wu, and H. C. Wu.** 2009. A novel peptide enhances therapeutic efficacy of liposomal anti-cancer drugs in mice models of human lung cancer. *PLoS One* **4**:e4171.

27. **Chono, S., Y. Tauchi, and K. Morimoto.** 2006. Influence of particle size on the distributions of liposomes to atherosclerotic lesions in mice. *Drug Dev Ind Pharm* **32**:125-35.
28. **Coates, A. R., and Y. Hu.** 2007. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Br J Pharmacol* **152**:1147-54.
29. **Constant, C. A., P. B. Ferreira, E. Valadas, and F. Antunes.** 2004. [Multi-drug-resistant tuberculosis in a Department of Infectious Diseases]. *Acta Med Port* **17**:157-66.
30. **Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye.** 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**:1009-21.
31. **Couvreur, P., and C. Vauthier.** 2006. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* **23**:1417-50.
32. **Dailey, L. A., T. Schmehl, T. Gessler, M. Wittmar, F. Grimminger, W. Seeger, and T. Kissel.** 2003. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J Control Release* **86**:131-44.
33. **Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S., Gupta, M. N.** 2007. Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609. *Biotechnol Appl Biochem* **51**:23-31.
34. **Daniel, T. M.** 2006. The history of tuberculosis. *Respir Med* **100**:1862-70.
35. **Daniel, T. M.** 2005. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *Int J Tuberc Lung Dis* **9**:944-5.

36. **Daniel, T. M.** 2005. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **9**:1181-2.
37. **Dannenberg, A. M., Jr.** 1993. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract (Off Ed)* **28**:51-8.
38. **Date, A. A., M. D. Joshi, and V. B. Patravale.** 2007. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:505-21.
39. **Dingler, A., and S. Gohla.** 2002. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J Microencapsul* **19**:11-6.
40. **Dou, H., J. Morehead, C. J. Destache, J. D. Kingsley, L. Shlyakhtenko, Y. Zhou, M. Chaubal, J. Werling, J. Kipp, B. E. Rabinow, and H. E. Gendelman.** 2007. Laboratory investigations for the morphologic, pharmacokinetic, and anti-retroviral properties of indinavir nanoparticles in human monocyte-derived macrophages. *Virology* **358**:148-58.
41. **du Toit, L. C., V. Pillay, and M. P. Danckwerts.** 2006. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respir Res* **7**:118.
42. **Dublanchet, A., and S. Bourne.** 2007. The epic of phage therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **18**:15-8.
43. **Dutt, M., and G. K. Khuller.** 2001. Chemotherapy of Mycobacterium tuberculosis infections in mice with a combination of isoniazid and rifampicin entrapped in Poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *J Antimicrob Chemother* **47**:829-35.
44. **Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M. C. Raviglione.** 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and

- mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282**:677-86.
45. **Ebbesen, M., and T. G. Jensen.** 2006. Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications. *J Biomed Biotechnol* **2006**:51516.
46. **Eckstein, T. M., S. Chandrasekaran, S. Mahapatra, M. R. McNeil, D. Chatterjee, C. D. Rithner, P. W. Ryan, J. T. Belisle, and J. M. Inamine.** 2006. A major cell wall lipopeptide of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *J Biol Chem* **281**:5209-15.
47. **Ernst, J. D., G. Trevejo-Nunez, and N. Banaiee.** 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest* **117**:1738-45.
48. **Fahy, E., S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, and E. A. Dennis.** 2005. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* **46**:839-61.
49. **Feng, B., S. Cheng, W. S. Pear, and H. C. Liou.** 2004. NF- $\kappa$ B inhibitor blocks B cell development at two checkpoints. *Med Immunol* **3**:1.
50. **Fiel, S. B.** 2001. History and evolution of aerosolized therapeutics: overview and introduction. *Chest* **120**:87S-88S.
51. **Flynn, J. L.** 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* **84**:93-101.
52. **Freitas, R. A., Jr.** 2005. What is nanomedicine? *Dis Mon* **51**:325-41.
-

53. **Fruciano, D. E., and S. Bourne.** 2007. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **18**:19-26.
  54. **Garcia, M., M. Pimentel, and J. Moniz-Pereira.** 2002. Expression of Mycobacteriophage Ms6 lysis genes is driven by two sigma(70)-like promoters and is dependent on a transcription termination signal present in the leader RNA. *J Bacteriol* **184**:3034-43.
  55. **Gelperina, S., K. Kisich, M. D. Iseman, and L. Heifets.** 2005. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:1487-90.
  56. **Gelperina, S. E., A. S. Khalansky, I. N. Skidan, Z. S. Smirnova, A. I. Bobruskin, S. E. Severin, B. Turowski, F. E. Zanella, and J. Kreuter.** 2002. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicol Lett* **126**:131-41.
  57. **Gil, F.** 2008. Caraterização do produto do gene *lysB* do módulo de lise do micobacteriófago Ms6. Faculdade de Medicina. Universidade de Lisboa, Lisboa.
  58. **Gil, F., M. J. Catalao, J. Moniz-Pereira, P. Leandro, M. McNeil, and M. Pimentel.** 2008. The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity. *Microbiology* **154**:1364-71.
  59. **Gillespie, S. H.** 2002. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:267-74.
  60. **Glynn, J. R.** 1998. Resurgence of tuberculosis and the impact of HIV infection. *Br Med Bull* **54**:579-93.
-

61. **Gomez, J. E., and J. D. McKinney.** 2004. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)* **84**:29-44.
62. **Gordon, R. J., and F. D. Lowy.** 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* **46 Suppl 5**:S350-9.
63. **Hanlon, G. W.** 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents* **30**:118-28.
64. **Hatfull, G. F., S. G. Cresawn, and R. W. Hendrix.** 2008. Comparative genomics of the mycobacteriophages: insights into bacteriophage evolution. *Res Microbiol* **159**:332-9.
65. **Hatfull, G. F., M. L. Pedulla, D. Jacobs-Sera, P. M. Cichon, A. Foley, M. E. Ford, R. M. Gonda, J. M. Houtz, A. J. Hryckowian, V. A. Kelchner, S. Namburi, K. V. Pajcini, M. G. Popovich, D. T. Schleicher, B. Z. Simanek, A. L. Smith, G. M. Zdanowicz, V. Kumar, C. L. Peebles, W. R. Jacobs, Jr., J. G. Lawrence, and R. W. Hendrix.** 2006. Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform. *PLoS Genet* **2**:e92.
66. **Hett, E. C., and E. J. Rubin.** 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:126-56, table of contents.
67. **Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito.** 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **9**:486-93.
68. **Iseman, M. D.** 2007. Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Charles Darwin would understand. *Clin Infect Dis* **45**:1415-6.
69. **Iseman, M. D.** 2002. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J Suppl* **36**:87s-94s.

70. **Jarlier, V., and H. Nikaido.** 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **123**:11-8.
71. **Jawahar, M. S.** 2004. Current trends in chemotherapy of tuberculosis. *Indian J Med Res* **120**:398-417.
72. **Jenning, V., A. F. Thunemann, and S. H. Gohla.** 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* **199**:167-77.
73. **Justo, O. R., and A. M. Moraes.** 2003. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation. *Drug Deliv* **10**:201-7.
74. **Kagan, V. E., H. Bayir, and A. A. Shvedova.** 2005. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. *Nanomedicine* **1**:313-6.
75. **Kaufmann, S. H.** 2006. Tuberculosis: back on the immunologists' agenda. *Immunity* **24**:351-7.
76. **Khuller, G. K., M. Kapur, and S. Sharma.** 2004. Liposome technology for drug delivery against mycobacterial infections. *Curr Pharm Des* **10**:3263-74.
77. **Kisich, K. O., S. Gelperina, M. P. Higgins, S. Wilson, E. Shipulo, E. Oganessian, and L. Heifets.** 2007. Encapsulation of moxifloxacin within poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles enhances efficacy against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Pharm* **345**:154-62.
78. **Kraft, W., H. E. Greenberg, and S. A. Waldman.** 1998. Paradoxical hypotension and bradycardia after intravenous arginine vasopressin. *J Clin Pharmacol* **38**:283-6.
79. **Kropinski, A. M.** 2006. Phage Therapy - Everything Old is New Again. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**:297-306.

80. **Labiris, N. R., and M. B. Dolovich.** 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* **56**:588-99.
81. **Loddenkemper, R., D. Sagebiel, and A. Brendel.** 2002. Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J Suppl* **36**:66s-77s.
82. **Loessner, M. J.** 2005. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**:480-7.
83. **Lu, T. K., and J. J. Collins.** 2009. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4629-34.
84. **Madariaga, M. G., U. G. Lalloo, and S. Swindells.** 2008. Extensively drug-resistant tuberculosis. *Am J Med* **121**:835-44.
85. **Maniloff, J., and H. W. Ackermann.** 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. *Arch Virol* **143**:2051-63.
86. **Mathema, B., N. E. Kurepina, P. J. Bifani, and B. N. Kreiswirth.** 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* **19**:658-85.
87. **Matsuzaki, S., M. Rashel, J. Uchiyama, S. Sakurai, T. Ujihara, M. Kuroda, M. Ikeuchi, T. Tani, M. Fujieda, H. Wakiguchi, and S. Imai.** 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* **11**:211-9.
88. **McDonough, K. A., Y. Kress, and B. R. Bloom.** 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun* **61**:2763-73.

89. **Medina, C., M. J. Santos-Martinez, A. Radomski, O. I. Corrigan, and M. W. Radomski.** 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* **150**:552-8.
  90. **Mehnert, W., and K. Mader.** 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* **47**:165-96.
  91. **Moghimi, S. M., A. C. Hunter, and J. C. Murray.** 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb J* **19**:311-30.
  92. **Muller, R. H., K. Mader, and S. Gohla.** 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* **50**:161-77.
  93. **Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A.** 2005. *Medical Microbiology*, 5 ed. Elsevier.
  94. **Muttil, P., J. Kaur, K. Kumar, A. B. Yadav, R. Sharma, and A. Misra.** 2007. Inhalable microparticles containing large payload of anti-tuberculosis drugs. *Eur J Pharm Sci* **32**:140-50.
  95. **Nelson, D.** 2004. Phage taxonomy: we agree to disagree. *J Bacteriol* **186**:7029-31.
  96. **O'Driscoll, C. M.** 2002. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci* **15**:405-15.
  97. **Oh, Y. K., D. E. Nix, and R. M. Straubinger.** 1995. Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2104-11.
  98. **Organization, W. H.** 2009, posting date. 2009 update TUBERCULOSIS FACTS. [Online.]
-

- 
99. **Organization, W. H.** 2009, posting date. Countries that had reported at least oneXDR-TB case by September 2009. [Online.]
  100. **Organization, W. H.** 2009. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. World Health Organization.
  101. **Organization, W. H.** 2008. Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing.
  102. **Organization, W. H.** 2008. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO publications, Geneva.
  103. **Pandey, R., and G. K. Khuller.** 2005. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *J Antimicrob Chemother* **55**:430-5.
  104. **Pandey, R., A. Sharma, A. Zahoor, S. Sharma, G. K. Khuller, and B. Prasad.** 2003. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* **52**:981-6.
  105. **Pandey, R., S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2006. Chemotherapeutic efficacy of nanoparticle encapsulated antitubercular drugs. *Drug Deliv* **13**:287-94.
  106. **Pandey, R., S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2004. Nebulization of liposome encapsulated antitubercular drugs in guinea pigs. *Int J Antimicrob Agents* **24**:93-4.
  107. **Pandey, R., S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2005. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis (Edinb)* **85**:415-20.
  108. **Pandey, R., A. Zahoor, S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2003. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **83**:373-8.
  109. **Park, K.** 2007. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *J Control Release* **120**:1-3.
-

110. **Pedulla, M. L., M. E. Ford, J. M. Houtz, T. Karthikeyan, C. Wadsworth, J. A. Lewis, D. Jacobs-Sera, J. Falbo, J. Gross, N. R. Pannunzio, W. Brucker, V. Kumar, J. Kandasamy, L. Keenan, S. Bardarov, J. Kriakov, J. G. Lawrence, W. R. Jacobs, Jr., R. W. Hendrix, and G. F. Hatfull.** 2003. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**:171-82.
111. **Pereverzeva, E., I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, K. Langer, S. Dreis, B. Asmussen, J. Kreuter, and S. Gelperina.** 2007. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: focus on cardio- and testicular toxicity. *Int J Pharm* **337**:346-56.
112. **Petty, N. K., T. J. Evans, P. C. Fineran, and G. P. Salmond.** 2007. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol* **25**:7-15.
113. **Pinto-Alphandary, H., A. Andreumont, and P. Couvreur.** 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int J Antimicrob Agents* **13**:155-68.
114. **Pison, U., T. Welte, M. Giersig, and D. A. Groneberg.** 2006. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur J Pharmacol* **533**:341-50.
115. **Piuri, M., W. R. Jacobs, Jr., and G. F. Hatfull.** 2009. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **4**:e4870.
116. **Portney, N. G., and M. Ozkan.** 2006. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal Bioanal Chem* **384**:620-30.
117. **Portugal, I., E. Anes, and J. Moniz-Pereira.** 1989. Temperate mycobacteriophage from *M. smegmatis*. *Acta Leprol* **7 Suppl 1**:243-4.

118. **Rastogi, R., Y. Sultana, A. Ali, and M. Aqil.** 2006. Particulate and vesicular drug carriers in the management of tuberculosis. *Curr Drug Deliv* **3**:121-8.
119. **Rau, J. L.** 2005. The inhalation of drugs: advantages and problems. *Respir Care* **50**:367-82.
120. **Raviglione, M. C., A. D. Harries, R. Msiska, D. Wilkinson, and P. Nunn.** 1997. Tuberculosis and HIV: current status in Africa. *AIDS* **11 Suppl B**:S115-23.
121. **Sacks, L. V., and R. E. Behrman.** 2008. Developing new drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a regulatory perspective. *Tuberculosis (Edinb)* **88 Suppl 1**:S93-100.
122. **Sakula, A.** 1983. BCG: who were Calmette and Guerin? *Thorax* **38**:806-12.
123. **Sarmento, B., S. Martins, D. Ferreira, and E. B. Souto.** 2007. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **2**:743-9.
124. **Saunders, N. A.** 1995. State of the art: typing *Mycobacterium tuberculosis*. *J Hosp Infect* **29**:169-76.
125. **Schrag, S. J., L. McGee, C. G. Whitney, B. Beall, A. S. Craig, M. E. Choate, J. H. Jorgensen, R. R. Facklam, and K. P. Klugman.** 2004. Emergence of *Streptococcus pneumoniae* with very-high-level resistance to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3016-23.
126. **Selwyn, P. A., D. Hartel, V. A. Lewis, E. E. Schoenbaum, S. H. Vermund, R. S. Klein, A. T. Walker, and G. H. Friedland.** 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **320**:545-50.

127. **Sharma, A., S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2004. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* **54**:761-6.
128. **Sharma, R., D. Saxena, A. K. Dwivedi, and A. Misra.** 2001. Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharm Res* **18**:1405-10.
129. **Sharma, S. K., and A. Mohan.** 2006. Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest* **130**:261-72.
130. **Shoyele, S. A., and A. Slowey.** 2006. Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* **314**:1-8.
131. **Smola, M., T. Vandamme, and A. Sokolowski.** 2008. Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases. *Int J Nanomedicine* **3**:1-19.
132. **Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs, Jr.** 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **4**:1911-9.
133. **Suarez, S., P. O'Hara, M. Kazantseva, C. E. Newcomer, R. Hopper, D. N. McMurray, and A. J. Hickey.** 2001. Airways delivery of rifampicin microparticles for the treatment of tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* **48**:431-4.
134. **Sulakvelidze, A., Z. Alavidze, and J. G. Morris, Jr.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:649-59.
135. **Sundaramurthy, V., and J. Pieters.** 2007. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes Infect* **9**:1671-9.

136. **Sung, J. C., B. L. Pulliam, and D. A. Edwards.** 2007. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends Biotechnol* **25**:563-70.
137. **Thanoo, B. C., M. C. Sunny, and A. Jayakrishnan.** 1992. Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals. *J Pharm Pharmacol* **44**:283-6.
138. **Thomas, D. A., M. A. Myers, B. Wichert, H. Schreier, and R. J. Gonzalez-Rothi.** 1991. Acute effects of liposome aerosol inhalation on pulmonary function in healthy human volunteers. *Chest* **99**:1268-70.
139. **Tortoli, E., P. Cichero, C. Piersimoni, M. T. Simonetti, G. Gesu, and D. Nista.** 1999. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* **37**:3578-82.
140. **Tough, D. F., S. Sun, and J. Sprent.** 1997. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* **185**:2089-94.
141. **Tripathi, R. P., N. Tewari, N. Dwivedi, and V. K. Tiwari.** 2005. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. *Med Res Rev* **25**:93-131.
142. **Valadas, E., and F. Antunes.** 2005. Tuberculosis, a re-emergent disease. *Eur J Radiol* **55**:154-7.
143. **Vasir, J. K., and V. Labhsetwar.** 2007. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:718-28.
144. **Videira, M. A.** 2008. Nanopartículas lipídicas como sistemas transportadores de fármacos para administração pulmonar. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa, Lisboa.

145. **Videira, M. A., M. F. Botelho, A. C. Santos, L. F. Gouveia, J. J. de Lima, and A. J. Almeida.** 2002. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J Drug Target* **10**:607-13.
146. **Videira, M. A., L. Gano, C. Santos, M. Neves, and A. J. Almeida.** 2006. Lymphatic uptake of lipid nanoparticles following endotracheal administration. *J Microencapsul* **23**:855-62.
147. **Vyas, S. P., M. E. Kannan, S. Jain, V. Mishra, and P. Singh.** 2004. Design of liposomal aerosols for improved delivery of rifampicin to alveolar macrophages. *Int J Pharm* **269**:37-49.
148. **Vyas, S. P., and K. Khatri.** 2007. Liposome-based drug delivery to alveolar macrophages. *Expert Opin Drug Deliv* **4**:95-9.
149. **Walde, P., and S. Ichikawa.** 2001. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol Eng* **18**:143-77.
150. **Watanabe, R., T. Matsumoto, G. Sano, Y. Ishii, K. Tateda, Y. Sumiyama, J. Uchiyama, S. Sakurai, S. Matsuzaki, S. Imai, and K. Yamaguchi.** 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:446-52.
151. **Westwater, C., L. M. Kasman, D. A. Schofield, P. A. Werner, J. W. Dolan, M. G. Schmidt, and J. S. Norris.** 2003. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1301-7.
152. **Wissing, S. A., O. Kayser, and R. H. Muller.** 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **56**:1257-72.

153. **Yacoby, I., M. Shamis, H. Bar, D. Shabat, and I. Benhar.** 2006. Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophages. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2087-97.
154. **Yoshida, A., M. Matumoto, H. Hshizume, Y. Oba, T. Tomishige, H. Inagawa, C. Kohchi, M. Hino, F. Ito, K. Tomoda, T. Nakajima, K. Makino, H. Terada, H. Hori, and G. Soma.** 2006. Selective delivery of rifampicin incorporated into poly(DL-lactic-co-glycolic) acid microspheres after phagocytotic uptake by alveolar macrophages, and the killing effect against intracellular *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin. *Microbes Infect* **8**:2484-91.
155. **Young, D., J. Stark, and D. Kirschner.** 2008. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nat Rev Microbiol* **6**:520-8.
156. **Young, I., I. Wang, and W. D. Roof.** 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* **8**:120-8.
157. **Zahoor, A., S. Sharma, and G. K. Khuller.** 2005. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents* **26**:298-303.
158. **Zhou, H., Y. Zhang, D. L. Biggs, M. C. Manning, T. W. Randolph, U. Christians, B. M. Hybertson, and K. Y. Ng.** 2005. Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages. *J Control Release* **107**:288-99.