



USO DA PROTEÍNA ADESINA CAM87009.1 NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAS CONTRA *Acinetobacter baumannii*

THAYNÁ LANER CARDOSO¹; STELLA BUCHHORN DE FREITAS²;
AMILTON SEIXAS NETO³; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK⁴; DAIANE
DRAWANZ HARTWIG⁵; MARTA GONÇALVES AMARAL⁶

¹Universidade Federal de Pelotas– nanalaner@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – stellafreitas@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - martagamaral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram negativa, com morfologia característica de cocobacilos, catalase-positiva, imóvel, não fermentadora, encontrada naturalmente no trato gastrointestinal de humanos e animais saudáveis

(PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Apesar de apresentar baixa virulência quando comparada a outros patógenos Gram-negativos, é a espécie melhor caracterizada do gênero *Acinetobacter*, é considerada a mais importante tanto em aspectos clínicos quanto epidemiológicos (BOLOURCHI *et al.*, 2019).

A. baumannii apresenta uma elevada capacidade de persistência ambiental e de aquisição de mecanismos de resistência, sendo assim capaz de colonizar objetos inanimados em ambientes hospitalares, como cateteres, leitos, bancadas, dentre outros (BOLOURCHI *et al.*, 2019; MARTINS; BARTH, 2013). Considerado um patógeno oportunista, é responsável pela ocorrência de surtos de Infecções Relacionadas ao Atendimento em Saúde (IRAS) ao redor do mundo, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), geralmente sendo associada à baixa imunidade dos pacientes internados (BRAUN; VIDOTTO, 2004; VIEIRA; PICOLI, 2015).

O aumento da incidência de infecções causadas por cepas multidroga-resistentes (MDR) tem gerado grandes preocupações, pois resultam em tratamentos limitados e muitas vezes ineficazes, ressaltando assim, a urgência no desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas para o controle desse patógeno (ALEKSIC SABO *et al.*, 2020; BOLOURCHI *et al.*, 2019). A imunoterapia tem demonstrado ser uma excelente alternativa, de modo que diversos estudos recentes avaliam抗ígenos de *A. baumannii* como alvos no desenvolvimento de terapias baseadas em anticorpos (LUO *et al.*, 2012).

As fímbrias são estruturas extracelulares que demonstram um elevado potencial para estimular uma resposta imune eficaz, reduzir o nível de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a taxa de sobrevivência (SINGH *et al.*, 2016). São importantes na adesão do patógeno às células dos hospedeiros, além de atuar no processo da formação e manutenção do biofilme bacteriano (LALAND *et al.*, 2015). CAM87009.1 é uma proteína fimbrial do tipo adesina, conservada dentro da espécie *A. baumannii*, não homologa a proteínas humanas e apresenta um elevado potencial de adesão (NI *et al.*, 2017).

Desse modo, terapias anti-fímbrias demonstram ser promissoras para tratamento alternativo de infecções causadas por *A. baumannii*, sendo eficazes na prevenção do processo de adesão, colonização e desenvolvimento de infecções.



Assim, o presente trabalho busca avaliar o potencial imunogênico da proteína CAM87009.1, uma fímbria do tipo adesina conservada em *A. baumannii*, para a produção de anticorpos policlonais (pAbs) em modelos murinos.

2. METODOLOGIA

Produção de anticorpos em murinos: Para a experimentação animal, foram utilizados seis camundongos BALB/c fêmeas, de idade entre 6-8 semanas. Para a indução da formação dos anticorpos, foi utilizada a proteína recombinante CAM87009.1, a qual foi clonada, expressa e purificada previamente (FREITAS, 2020). Os animais foram separados em três grupos contendo dois animais cada, sendo os grupos: 1) animais imunizados com rCAM87009.1 acrescido de adjuvante; 2) animais não submetidos a nenhuma inoculação e 3) animais inoculados com rCAM87009.1 acrescido do diluente da proteína (PBS 1x 1,08 M de uréia). Desse modo, os grupos 2 e 3 foram utilizados como controles. A produção de pAbs foi realizada com uma inoculação intraperitoneal de 100 µg de rCAM87009.1 nos animais nos dias 0, 14, 21 e 28. Os animais inoculados com PBS foram submetidos ao mesmo protocolo de imunização aplicado na produção de pAbs. A primeira dose foi aplicada com a adição do adjuvante completo de *Freund* (*Sigma-Aldrich, EUA*) na diluição 1:1, enquanto nas doses seguintes foi utilizado o adjuvante incompleto de *Freund* (*Sigma-Aldrich, EUA*). Antes de cada inoculação, amostras de sangue foram coletadas através do plexo retro orbital dos animais e submetidas a centrifugação (3.000 x g, 5 min) para obtenção do soro. No 35º dia do experimento, todos os animais foram eutanasiados e o sangue total foi coletado através da técnica de punção cardíaca para posterior obtenção de soro. Todas as amostras de soros coletadas foram armazenadas sob temperatura de -20°C. Um WB e um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) foram aplicados para avaliar a produção de pAbs e a resposta imune gerada nos camundongos.

Titulação dos anticorpos: Foi realizado um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para avaliar a produção dos anticorpos em camundongos. Para isso, as placas de poliestireno de 96 poços (Cralplast, Brasil) foram revestidas com 15 µg de rCAM87009.1 por poço e mantidas a 4°C, durante 16-18h. A adição do pAbs anti-rCAM87009.1 foi realizada através de uma diluição seriada de base 2, variando de 1:100 a 1:1.638.400. Os soros dos animais foram analisados em pools de acordo com os dias do protocolo de inoculação para todos os grupos. Após a incubação (1h, 37°C), foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Invitrogen, EUA) na diluição de 1:6.000. A visualização da reação ocorreu pelo uso do tampão de revelação (tampão citrato fosfato 0,1M pH 4, dicloridrato de o-fenilenodiamina 0,2 mg/ml e peróxido de hidrogênio 0,03%) e interrompida pela adição da solução H₂SO₄ 2M. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro (*Biochrom*, Inglaterra) com um comprimento de onda de 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros coletados dos animais imunizados com rCAM87009.1 apresentaram uma resposta imune de anticorpos IgG significativa logo após a primeira imunização (dia 14, $p<0,001$), como pode ser observado na Figura 1. Essa resposta permaneceu até o 35º de experimentação. Os animais imunizados com PBS + adjuvante não tiveram uma resposta de anticorpos IgG detectável (Figura 1).

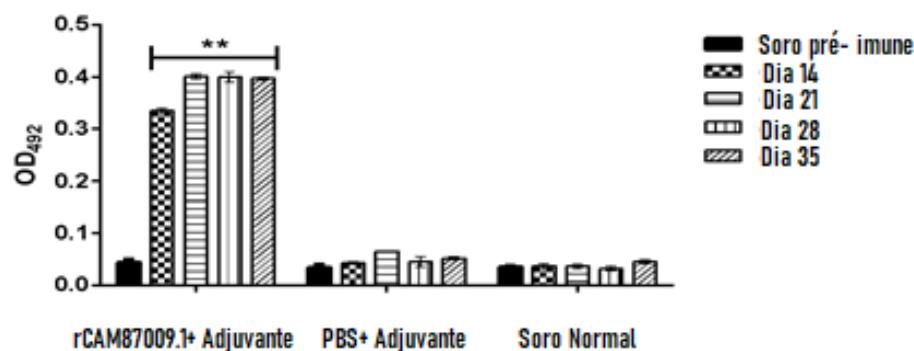
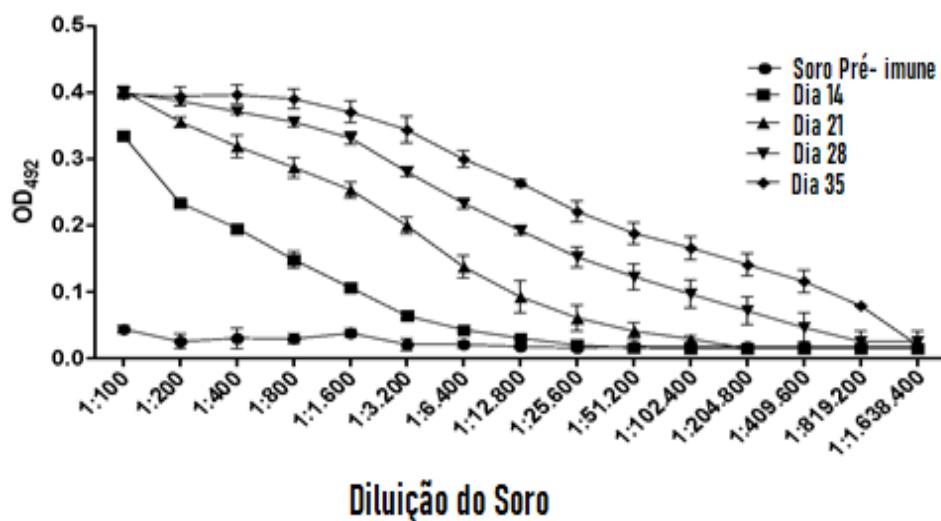


Figura 1: Resposta de anticorpos IgG em camundongos imunizados com rCAM87009.1. A significância foi determinada pela análise de variância (comparação múltipla de Tukey). O asterisco representa uma diferença em comparação com o soro normal, $**p<0,001$.

Os animais imunizados com quatro doses de rCAM87009.1 apresentaram um título de 1:6.400 no dia 14 ($p<0,05$), 1:25.600 no dia 21 ($p<0,05$), 1:204.800 no dia 28 ($p<0,05$) e 1:819.200 no dia 35 ($p<0,05$), em comparação com o soro normal (Figura 2). Essa titulação indica o caráter imunogênico da proteína, demonstrando sua importância nas infecções *in vivo* e seu potencial para aplicação em vacinas e estratégias terapêuticas (SINGH *et al.*, 2016).



	Titulação	
Dia 14	1:6.400	$p<0,05$
Dia 21	1:25.600	$p<0,05$
Dia 28	1:204.800	$p<0,05$
Dia 35	1:819.200	$p<0,05$

Figura 2: Curva de titulação dos anticorpos IgG gerados contra rCAM87009.1 e presentes no soro dos camundongos imunizados. O título dos anticorpos em diferentes tempos foi determinado pela diluição em série do soro (1:100 a 1:1.638.400). As placas foram revestidas com a proteína rCAM87009.1.

Estudos realizados através de ensaios de imunização com a utilização de proteínas fimbriadas de *A. baumannii*, também demonstraram que essas estruturas apresentam antigenicidade e imunogenicidade (SINGH *et al.*, 2016; SKERNISKYTÉ *et al.*, 2019). Assim, nossos resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores, que avaliaram previamente o potencial de proteínas fimbriais na imunização de murinos, resultando em uma significativa produção de

anticorpos e na proteção desses animais (KUOLEE *et al.*, 2015).

4. CONCLUSÕES

A proteína rCAM87009.1 quando utilizada na imunização de camundongos, foi capaz de induzir níveis significativos de anticorpos IgG. Esses anticorpos podem servir como uma futura alternativa terapêutica não antibiótica no controle de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSIC SABO, Verica *et al.* Anti-Acinetobacter baumannii activity of Rumex crispus L. And Rumex sanguineus L. extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 172–182, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2221-1691.280294>
- BOLOURCHI, Negin *et al.* Immunogenic reactivity of recombinant PKF and AbOmpA proteins as serum resistance factors against sepsis of Acinetobacter baumannii. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 131, n. October 2018, p. 9–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.031>
- BRAUN, Graziela; VIDOTTO, Marilda Carlos. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of Acinetobacter baumannii causing urinary tract infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 99, n. 8, p. 839–844, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000800010>
- FREITAS, Stella Buchhorn de. **rCAM87009.1: uma proteína adesina hipotética induz anticorpos anti-biofilme contra Acinetobacter baumanii multi-droga resistente (MDR)**. 2020. - Universidade Federal de Pelotas, [s. l.], 2020.
- KUOLEE, Rhonda *et al.* Intranasal immunization protects against Acinetobacter baumannii-associated pneumonia in mice. **Vaccine**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 260–267, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.083>
- LALAND, Kevin N. *et al.* The extended evolutionary synthesis: Its structure, assumptions and predictions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 282, n. 1813, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1019>
- LUO, Guanpingshen *et al.* Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-Acinetobacter baumannii infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029446>
- MARTINS, Andreza Francisco; BARTH, Afonso Luís. Multidrug-resistant acinetobacter - A challenge for public health. **Scientia Medica**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 56–62, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.15448/1980-6108.2013.1.12563>
- NI, Zhaojun *et al.* Antibiotic resistance determinant-focused Acinetobacter baumannii vaccine designed using reverse vaccinology. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 1–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18020458>
- PELEG, Anton Y.; SEIFERT, Harald; PATERSON, David L. Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07>
- SINGH, Ravinder *et al.* Immunoprotective efficacy of Acinetobacter baumannii outer membrane protein, FilF, predicted in silico as a potential vaccine candidate. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. FEB, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00158>
- SKERNÍŠKYTĚ, Jüratě *et al.* Blp1 protein shows virulence-associated features and elicits protective immunity to Acinetobacter baumannii infection. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1615-3>
- VIEIRA, PB; PICOLI, SU. Acinetobacter baumannii Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 151–156, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4034/rbcs.2015.19.02.10>