

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rFilF E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

ISABEL LADEIRA PEREIRA¹; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK²; THAYNÁ LANER CARDOSO³; PAMELA SCARAFFUNI CABALLERO⁴; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO⁵; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelladeirapereira@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - nanalaner@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - pamelascaraffuni@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - amiltonseixas@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é uma bactéria oportunista de grande relevância clínica associada à ocorrência de infecções nosocomiais ao redor do mundo nas últimas décadas, sendo comumente encontrado em diferentes sítios de infecção em pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTI) (LI *et al.*, 2015; PELEG *et al.*, 2008). A capacidade de sobreviver à condições adversas e em superfícies, o crescimento em biofilme e o fenótipo multidroga resistente (MDR), fazem dessa espécie uma ameaça a saúde pública. Essas características, somadas a escassez de alternativas terapêuticas no combate de cepas resistentes aos antimicrobianos, tornam o controle deste patógeno muito difícil (HARDING *et al.*, 2018).

Entendendo o risco das infecções por *A. baumannii*, torna-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o controle deste patógeno. A vacinação de pacientes com risco e a imunoterapia baseada no uso de anticorpos tem se mostrado como promissoras estratégias para prevenir infecções e melhorar o prognóstico de pacientes já infectados, a fim de driblar a ausência de terapias efetivas para cepas resistentes (MCCONNELL & PACHÓN, 2010). Como alvo para o desenvolvimento de anticorpos específico destacam-se antígenos de superfície, como proteínas associadas à anexos externos da bactéria, por exemplo, as fímbrias. As fímbrias são muito importantes na formação de biofilme e na adesão do patógeno à célula hospedeira, uma vez que tem um papel inicial na infecção. A proteína fimbrial FilF (67 kDa) está presente em *A. baumannii* e não tem nenhuma homologia com proteínas humanas. Essa proteína já foi demonstrada, por vacinologia reversa, como um potencial alvo para a produção de anticorpos (NI *et al.*, 2017).

Por isso, esse trabalho, visou a produção da proteína FilF em sua forma recombinante (rFilF), bem como a produção de anticorpos policlonais (pAbs) e avaliação de sua aplicabilidade como uma estratégia anti-biofilme, buscando uma alternativa promissora na terapêutica e controle de infecções causadas por *A. baumannii* MDR.

2. METODOLOGIA

O gene *filf* de *A. baumannii* foi sintetizado quimicamente (Genone – Soluções em Biotecnologia, Brasil) clonado em vetor pET28a e a proteína FilF foi expressa em sua forma recombinante (rFilF) no sistema de expressão heterólogo procarioto *Escherichia coli* BL21. A expressão de rFilF foi confirmada por *Western blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis (Sigma Aldrich, Co., Estados

Unidos). A antigenicidade da proteína rFilF foi determinada por ensaio *Western blotting* utilizando anticorpo produzido por camundongos infectados por *A. baumannii*.

Para a produção de anticorpos policlonais (pAbs) anti-rFilF, três camundongos BALB/C foram imunizados via intraperitoneal com 50 µg de rFilF acrescida de adjuvante completo (dia 0) ou incompleto de Freund (dias 14, 21, 28 e 35) (Conselho de Ética em Experimentação Animal/UFPEL Protocolo Nº 51427-2019). Como controle negativo do experimento, três animais foram inoculados com PBS 1x e adjuvante de Freund. Amostras de sangue foram coletadas em todos tempos experimentais para posterior separação do soro e avaliação dos pAbs anti-rFilF por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 200 ng de rFilF por poço, e bloqueadas com solução de leite em pó 0,5% para prevenir ligações não específicas. Após, os pAbs anti-rFilF e o soro do grupo controle foram adicionados em uma concentração de 1:50 em PBS 1x, e então anticorpos monoclonais anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma Aldrich, Co., Estados Unidos) foram adicionados nas concentrações pré-estabelecidas pelo fabricante (1:10.000). As reações foram visualizadas com solução substrato-cromógeno e lidas por absorbância a 492 nm.

A atividade anti-biofilme dos pAbs foi determinada frente 1×10^8 UFC/mL de inóculo bacteriano de *A. baumannii* ATCC®19606 e nove isolados clínicos Ab-MDR em diferentes concentrações: 1:50, 1:100 e 1:200 em caldo triptona de soja. Como controle foi utilizado inóculo bacteriano sem tratamento. Após crescimento *overnight* a 37°C, o biofilme foi fixado com metanol P.A., corado com cristal violeta 0,5% e desprendido com etanol 95%. A absorbância foi mensurada por espectrofotometria (comprimento de onda 570nm).

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas entre as amostras foram determinadas por análises de variância (ANOVA de duas vias) e teste Tukey. Valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo e os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão. A análise foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 8.0.1. (GraphPad Inc., EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rFilF foi eficientemente expressa em sua forma insolúvel, no tamanho esperado de 67 kDa, mantendo-se antigênica visto que foi reconhecida por anticorpos contra *A. baumannii* (Figura 1).

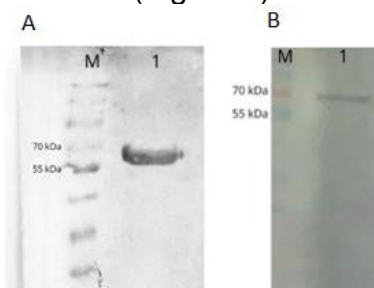


Figura 1: Ensaio *Western blotting* da proteína rFilF. A) Caracterização de rFilF com anticorpo monoclonal anti-6xHis. (M) Marcador de massa molecular; (1) rFilF purificada. B) Antigenicidade de rFilF com soro anti-*A. baumannii* de camundongo. (M) Marcador de massa molecular; (1) rFilF purificada.

Amostras de soro dos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 foram avaliadas por ensaio ELISA sendo observada uma produção significativa de anticorpos IgG anti-rFilF nos animais imunizados com rFilF ($p < 0,001$) desde a primeira imunização (Figura 2).

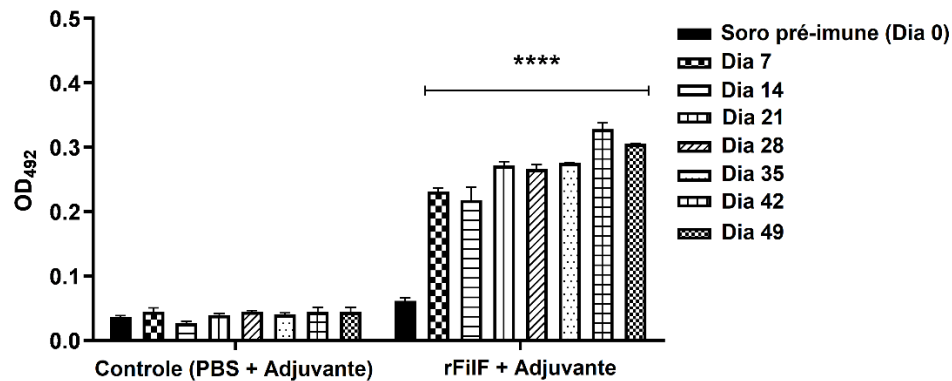


Figura 2: Produção de IgG anti-rFilF em camundongos.

*** $p < 0,001$ representa a diferença comparada entre grupos controles (PBS + adjuvante e soro pré-imune).

A avaliação da capacidade anti-biofilme dos pAbs anti-rFilF foi avaliada em cepas com diferentes padrões de formação de biofilme e mostrou que os anticorpos foram capazes de reduzir em até 93% ($p < 0,001$) a formação de biofilmes em *A. baumannii*. Obteve-se diferenças estatísticas significativas na inibição da formação de biofilme em todas as cepas e em todas as diluições de soro testadas (1:50, 1:100 e 1:200) (Figura 3). Não houve inibição de biofilme quando a cepa padrão ATCC® 19606 e os nove isolados clínicos foram tratados com soro não-imune (animais imunizados com PBS 1x e adjuvante).

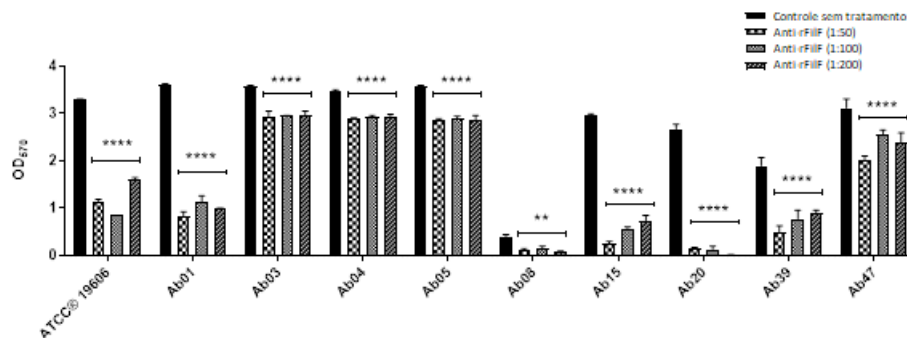


Figura 3: Atividade anti-biofilme de pAbs anti-rFilF. Diferentes diluições de soro anti-rFilF (1:50, 1:100 e 1:200) foram incubadas com 1×10^8 UFC/mL de ATCC® 19606 e nove isolados clínicos de *A. baumannii*. Controle negativo representa a formação de biofilme sem tratamento com soro anti-rFilF. Valores de * $p < 0,05$ e **** $p < 0,001$.

Os isolados analisados neste trabalho apresentam resistência à pelo menos um fármaco da classe dos carbapenêmicos, como meropenem e imipenem. Em 2017, a Organização Mundial de Saúde elencou os patógenos considerados prioridade crítica para o desenvolvimento de novos antibióticos, e as cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos obtiveram o primeiro lugar (MONEM *et al.*, 2020). Já foi demonstrado que cepas não MDR após formarem biofilme desenvolvem resistência ao imipenem, que normalmente pode penetrar a matriz do

biofilme, o que pode ser resultado da expressão de enzimas β -lactamases ou do sistema de efluxo, que está altamente envolvido na síntese e transporte de moléculas durante a formação de biofilme (SHENKUTIE *et al.*, 2020). Os isolados que apresentaram maior redução de crescimento em biofilme com tratamento com pAbs anti-rFilF foram Ab20 (93% de redução), Ab15 (91% de redução), Ab01 (77% de redução) e Ab39 (74% de redução), que são fortes formadores de biofilmes, e resistentes ao imipenem, o que pode demonstrar a relevância dessa proteína durante a formação de biofilme em isolados MDR.

Atividade anti-biofilme *in vitro* depende de vários fatores, baseado em nossos resultados estima-se que os anticorpos anti-rFilF atuaram na neutralização da proteína FilF nativa de *A. baumannii*, inibindo o processo de formação de biofilme. Uma vez que, adesinas, como a FilF, tem um papel crucial na adesão da célula bacteriana e motilidade da mesma na construção do biofilme (BERNE *et al.*, 2015).

4. CONCLUSÕES

O tratamento *in vitro* com os pAbs anti-rFilF foi eficaz na inibição da formação de biofilmes em Ab-MDR, demonstrando ser uma abordagem terapêutica não-antibiótica promissora no controle de infecções causadas por esse patógeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNE, C., DUCRET, A., HARDY, G.G., BRUN, Y.V. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. **Microbiol Biofilms**, v. 9, 163-199, 2015.
- HARDING, C.M., HENNON, S.W., & FELDMAN, M.F. . Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 91–102, 2018.
- LI, Z.T., ZHANG, R.L., BI, X.G., XU, L., FAN, M., XIE, D., XIAN, Y., WANG, Y., LI, X.J., WU, Z.D., ZHANG, KX., Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. **Microbial Pathogenesis**, v. 81, p. 46–52. 2015.
- McCONNELL, M.J. & PACHÓN, J. Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine. **Vaccine**, v. 29, p. 1–5, 2010.
- MONEM, S., FURMANEK, B., LUPKOWSKA, A., KUCZYNSKA D., STOJOWSKA, K., LASKOWSKA E., Mechanisms Protecting *Acinetobacter baumannii* against Multiple Stresses Triggered by the Host Immune Response, Antibiotics and Outside-Host Environment, **International Journal of Molecular Science**, v., 21, p. 1-30, 2020.
- NI, Z., CHEN, Y., ONG, E., HE, Y. Antibiotic Resistance Determinant-Focused *Acinetobacter baumannii*. Vaccine Designed Using Reverse Vaccinology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18., n. 2, 2017.
- PELEG, A.Y., SEIFERT, H., & PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 538–582, 2008.
- SHENKUTIE, A.M., YAO, M.Z., SIU, G.K-H., WONG, B.K.C., LEUNG, P.H-M. Biofilm-Induced Antibiotic Resistance in Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates. **Antibiotics**, v. 9, p. 1-15, 2020.