

RESPOSTA IMUNE CELULAR INDUZIDA POR ANTÍGENO FIMBRIAL RECOMBINANTE DE *Acinetobacter baumannii*

ISABEL LADEIRA PEREIRA¹; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK²; THAYNÁ
LANER CARDOSO³, ANTÔNIO DUARTE PAGANO⁴, VINICIUS FARIAS
CAMPOS⁵, DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelladeirapereira@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nanalaner@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – antonioduarte pagano@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos vem crescendo e representa um desafio de saúde pública mundial, dificultando o tratamento de pacientes com infecções. Entre os microrganismos elencados como críticos pela Organização Mundial de Saúde, destaca-se *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos (WHO, 2024). Uma ampla variedade de mecanismos de resistência a antibióticos foi descrita para *A. baumannii*, como por exemplo: enzimas que degradam antibióticos, alterações no sítio de ligação e bombas de efluxo (KYRIAKIDIS *et al.*, 2021). Esses fatores desempenham um papel crucial no sucesso desse microrganismo em ambientes de saúde.

Compreendendo os riscos associados às infecções por *A. baumannii*, surge a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas alternativas para controlar esse patógeno. Além da pesquisa por novos antibacterianos, tratamentos mediados por anticorpos e vacinas profiláticas também vêm sendo investigados (PEREIRA *et al.*, 2025a). Na busca pela identificação de alvos para indução da resposta imunológica, as proteínas adesinas desempenham um papel crucial no contato inicial e na adesão da bactéria às células hospedeiras (PEREIRA *et al.*, 2025a; KLEMM & SCHEMBRI, 2000). A proteína fimbrial de membrana externa FilF já demonstrou proteção imunológica contra infecções letais por *A. baumannii* em camundongos (SINGH *et al.*, 2016).

Neste estudo, objetivou-se identificar a resposta imune celular de esplenócitos de camundongos imunizados com FilF recombinante. Investigar a expressão de citocinas e a ativação de vias imunológicas por esse antígeno contribui para evidenciar o seu potencial como candidato vacinal ou como insumo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

2. METODOLOGIA

O gene *filf* foi clonado no vetor pET28a e expresso no sistema heterólogo *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3), conforme descrito por PEREIRA *et al.* (2024). A proteína recombinante FilF (rFilF) foi obtida por cromatografia de afinidade ao níquel em um gradiente de imidazol e dialisada contra tampão fosfato salino (PBS 1x). O perfil eletroforético de rFilF foi observado por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e *Western blot* com anticorpos monoclonais anti-6x-His Tag (Invitrogen, EUA).

Quatro camundongos BALB/c (*Mus musculus*) de 6-8 semanas foram imunizados via intramuscular com 50 µg de antígeno recombinante (rFilF) acrescido de 15% de Alhydrogel® 2% (InvivoGen, EUA), em três doses (dias 0, 14 e 28), enquanto o grupo controle (n=4) recebeu o diluente da proteína (PBS 1x) acrescido de adjuvante. Semanalmente foram coletadas amostras de sangue pela veia submandibular para separação de soro dos animais. Catorze dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados com anestesia profunda com isoflurano - Forane® (Abbott, BRA) e exsanguinação por punção cardíaca. A produção de anticorpos IgG anti-rFilF foi avaliada em ensaio ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) com as amostras sorológicas dos camundongos.

Após eutanásia, o baço dos animais foi removido assepticamente para cultura de esplenócitos. Os procedimentos de experimentação animal foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPEL (Nº protocolo: 51427-2019). Após esplenectomia, os baços dos animais imunizados com rFilF e controle foram macerados e cultivados em *pools* em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose) (Sigma-Aldrich, Co., EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de solução de penicilina-estreptomicina e anfotericina B (Vitrocell, BRA) por 24 horas à 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. As células aderentes no cultivo primário de esplenócitos foram estimuladas com 10 µg de rFilF por 24 horas nas mesmas condições de incubação anteriores.

Após cultivo primário de esplenócitos, foi realizada a extração de RNA do conteúdo dos poços com TRIzol™ Reagent e PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, EUA). A expressão relativa de mRNA de genes associados à respostas pró- e anti-inflamatórias foi avaliada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR). Os genes avaliados foram: *tnfa* (Fator de Necrose Tumoral α), *ifny* (Interferon γ), *il1β* (Interleucina 1β), *il4* (Interleucina 4), *il10* (Interleucina 10) e *il33* (Interleucina 33). O gene *gapdh* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle endógeno. Os *primers* foram desenhados no Primer3 e testados quanto à eficiência e especificidade (PEREIRA *et al.*, 2025). As reações de qPCR foram realizadas no sistema QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems, EUA), utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA). Os valores de qPCR foram avaliados com teste t de Student para comparação entre dois grupos (imunizados e controle). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1. (GraphPad Inc., EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após expressão em *E. coli* BL21 Star™ (DE3) a proteína rFilF purificada e dialisada apresentou massa molecular esperada de ~67 kDa. A imunização de camundongos BALB/c com rFilF induziu resposta humoral significativa, evidenciada pelo aumento progressivo dos níveis de anticorpos IgG, observado através de ensaio ELISA.

A estimulação de culturas de esplenócitos de camundongos imunizados com rFilF resultou em aumento expressivo da expressão gênica de *il1β*, *il4* e *il10*, enquanto houve redução da expressão de *ifny* quando comparados ao grupo controle (Figura 1). Este perfil sugere a ativação de uma resposta imune adaptativa

balanceada, caracterizada pela indução de citocinas associadas à modulação anti-inflamatória e à promoção da imunidade do tipo 2 (Th2), que é fundamental para ativação e diferenciação de linfócitos B, favorecendo a produção de anticorpos de longa duração e de diferentes isotipos e a redução de inflamação excessiva (WANG *et al.*, 2024; SPELLBERG & EDWARDS, 2001).

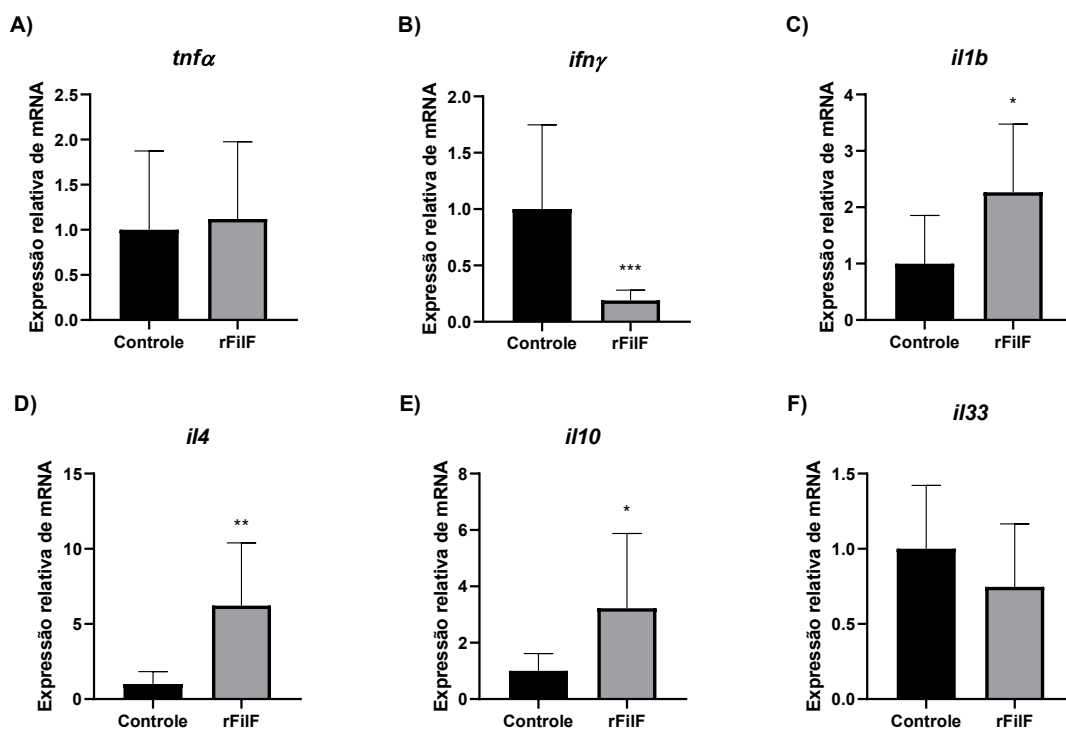


Figura 2: Os níveis relativos de expressão de mRNA de *tnfa* (A), *ifny* (B), *il1b* (C), *il4* (D), *il10* (E) e *il33* (F) foram avaliados por qPCR e normalizados em relação ao gene *gapdh*. Os valores estão apresentados como médio ± desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; teste t de Student).

O perfil observado, caracterizado pelo aumento da expressão de mRNA de *il1b* e *il10* no cultivo de esplenócitos do grupo vacinado está de acordo com o padrão de resposta imune descrito em infecções por *A. baumannii*, no qual, a IL-1 β atua como um mediador central entre a imunidade inata e adaptativa, estimulando a ativação de linfócitos T e recrutamento de neutrófilos, enquanto a IL-10 contribui para o controle da resposta inflamatória (GARCÍA-PATIÑO, GARCÍA-CONTRERAS & LICONA-LIMÓN, 2017). Por outro lado, a diminuição da expressão de *ifny* reforça a hipótese de uma regulação fina da resposta inflamatória, evitando o risco de tempestades de citocinas, situação que pode ser prejudicial especialmente em indivíduos imunocomprometidos (WANG *et al.*, 2024). Além disso, estudos anteriores já demonstraram que anticorpos policlonais anti-rFiIF promovem redução significativa na formação de biofilmes de cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos e potencializam a fagocitose mediada por anticorpos, evidenciando o potencial terapêutico da imunização com rFiIF para controle da infecção (PEREIRA *et al.*, 2024; PEREIRA *et al.*, 2025b). Estes resultados destacam o papel da imunidade induzida por rFiIF, que não só contribui para neutralização e opsonização do patógeno, mas também modula a resposta imune para um equilíbrio entre efetividade e segurança.

4. CONCLUSÕES

A resposta imune observada nos esplenócitos de animais vacinados com rFilF indica que essa imunização modula a resposta imune, favorecendo o equilíbrio entre atividade efetora e controle da inflamação. A continuidade dos estudos, é fundamental para validar a eficácia e segurança de rFilF como um candidato vacinal ou um insumo para produção de imunoterapêuticos contra infecções por *A. baumannii* multirresistente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GARCÍA-PATIÑO, M.G., GARCÍA-CONTRERAS, R.; LICONA-LIMÓN, P. The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial infections. **Frontiers in Immunology**, Suíça, v.8, p.1-10, 2017.
- KLEMM, P. & SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, Alemanha, v. 290, n.1, p. 27-35, 2000.
- KYRIAKIDIS, I; VASILEIOU, E.; PANA, Z.D.; TRAGIANNIDIS, A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. **Pathogens**, Suíça, v.10, n.3, p.1-20, 2021.
- PEREIRA, I.L.; CARDOSO, T.L., WOZEAK, D.R., CABALLERO, P.S., DE FREITAS, S.B., SEIXAS, A.C.P., PINTO, L.S., HARTWIG, D.D. Antibodies anti-rFilF protein has anti-biofilm activity against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbes and Infection**, França, v.26, n.5-6, p. 1-8, 2024.
- PEREIRA, I.L. & HARTWIG, D.D. Unveiling the role of adhesin proteins in controlling *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review. **Infection and Immunity**, Estados Unidos da América, v.93, n.2., p. 1-17, 2025a.
- PEREIRA, I.L., WOZEAK, D.R., PAGANO, A.D., CARDOSO, T.L., ACOSTA, I.B., VARELA, A.S.J, FISCHER, G., CAMPOS, V.F., HARTWIG, D.D. A promising approach to control carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Investigating immune pathways through rFilF immunization. **Microbial Pathogenesis**, Inglaterra, v. 206, p. 1-9, 2025b.
- SINGH, R.; GARG, N.; SHUKLA, G.; CAPALASH, N.; SHARMA, P. Immunoprotective efficacy of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein, FilF, predicted in silico as a potential vaccine candidate. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 7, p.1.9, 2016.
- SPELLBERG, B.; EDWARDS, J.E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. **Clinical Infectious Disease**, Inglaterra, v.32, n.1, p.76-102, 2001.
- WANG, H.; XU, Q.; HENG, H.; ZHAO, W.; NI, H.; CHEN, K.; CHAN, B.K.W.; TANG, Y.; XIE, M.; PENG, M.; CHAN, E.W.C.; YANG, G.; CHEN, S. High mortality of *Acinetobacter baumannii* infection is attributed to macrophage mediated induction of cytokine storm but preventable by naproxen. **eBioMedicine**, Holanda, v.108, p.1-19, 2024.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bacterial Priority Pathogens List**. 2024. Acessado em 13 de Agosto de 2025. Online. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>