

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS RECOMBINANTES CONTENDO EPÍTOPOS ANTIGÊNICOS DE *Bartonella henselae*

HENRIQUE QUEIROZ SIMÃO¹; JÊNIFER MALHEIROS GONÇALVES²;
AMANDA ROBERTA DE ALMEIDA³, DAIANE DRAWANZ HARTWIG^{2,4}

¹Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel, Pelotas/RS – henrique15@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel, Pelotas/RS

³Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas/SP

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas/RS -
daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Bartonella henselae é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Rhizobiales, de crescimento fastidioso, intracelular facultativa e que pode infectar eritrócitos e células endoteliais de seus hospedeiros (GIL et al., 2013). Os gatos (*Felis catus*) são considerados reservatórios primários de *B. henselae*, enquanto que os humanos são considerados hospedeiros acidentais (BREITSCHWERDT, 2017). Dentro do gênero *Bartonella*, existem aproximadamente 22 espécies relacionadas com doenças em mamíferos (PENNISI et al., 2013), e *B. henselae* é considerada uma das espécies de maior importância médica, uma vez que infecta tanto gatos quanto humanos (BREITSCHWERDT, 2017).

Estudos demonstram que a transmissão dessa bactéria para os gatos ocorre diretamente pelo contato com pulgas (*Ctenocephalides felis*), (BREITSCHWERDT, 2017; REGIER et al., 2016). Os gatos infectados albergam a bactéria no interior de seus eritrócitos, que podem ser ingeridos pelas pulgas, permanecendo em seu intestino. Posteriormente, as fezes destas pulgas contaminadas com *B. henselae* podem ser depositadas na pele dos gatos, e estes, ao se auto arranharem acabam contaminando suas garras (PENNISI et al., 2013). É dessa maneira que os humanos podem ser infectados, pela arranhadura de gatos, assim, *B. henselae* é considerada agente etiológico da Doença da Arranhadura do Gato (*Cat Scratch Disease* – CSD), que é uma infecção frequentemente auto-limitante em indivíduos imunocompetentes (REGIER et al., 2016), e tem como principal sintoma a linfadenopatia regional (GIL et al., 2013).

O diagnóstico preciso de bartonelose é um grande desafio, principalmente em pacientes com infecção crônica e de longa duração. Diversas técnicas convencionais têm demonstrado limitações diagnósticas. O diagnóstico padrão para essa doença é realizado por imunofluorescência indireta utilizando antígenos de células inteiras co-cultivadas em células Vero, que tem boa sensibilidade, no entanto, são caros e costumam apresentar reações cruzadas. Um método de diagnóstico que vem sendo muito utilizado é o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), que utiliza antígenos de células inteiras, no entanto, apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade, assim, a utilização de proteínas purificadas poderia melhorar o diagnóstico desta doença (FERRARA et al., 2014). Alguns estudos com proteínas recombinantes têm sido publicados. Nestes, proteínas reconhecidamente antigênicas, como GroEL e 17-kDa (FERRARA et al., 2014), Pap31 (ANGKASEKWINAI et al., 2014), SucB (LITWIN et al., 2004) e P26 (WERNER et al., 2008) têm sido produzidas de forma recombinante, e têm sido testadas em ensaios sorológicos, principalmente no ELISA. Entretanto, em todos os ensaios as proteínas foram utilizadas de forma isolada, e, de forma geral, apresentaram baixa sensibilidade, o que reforça a necessidade do desenvolvimento de quimeras, o que poderia tornar os ensaios mais sensíveis e específicos. Assim, o objetivo desse estudo, foi a predição *in silico* de epítopos

estimuladores de linfócitos B e T, em proteínas antigênicas de *B. henselae* e a produção de proteínas quiméricas de maneira recombinante para uso em diagnóstico sorológico.

2. METODOLOGIA

Proteínas antigênicas de *B. henselae* foram selecionadas, a partir de estudos prévios encontrados na literatura e analisadas através de preditores disponíveis *online*. O preditor *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (www.iedb.org) foi utilizado para a predição de epítomos de linfócitos B e T de humanos e gatos nas proteínas selecionadas. A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) foi aplicada para o descobrimento de regiões contendo similaridades entre as sequências das proteínas alvo.

O uso de tais ferramentas auxiliou na escolha de epítomos antigênicos de *B. henselae* para uso em diagnóstico sorológico. Após a identificação, as sequências dos epítomos foram sintetizadas pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil), gerando os genes sintéticos das quimeras Q1 ($\approx$ 992 pb), Q2 ($\approx$ 965 pb) e Q3 ($\approx$ 1019 pb), estes foram obtidos clonados no vetor pAE, fundido com uma cauda N-terminal de 6 $\times$ His. Os plasmídeos chamados pAE/Q1, pAE/Q2 e pAE/Q3 foram utilizados para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star para produção das proteínas quiméricas recombinantes (rQ1, rQ2 e rQ3). A expressão das proteínas rQ1, rQ2 e rQ3 foi verificada por ensaio *Western Blot* (WB), a partir da reação com anticorpos anti-histidina, diluídos 1:10.000 (Sigma-Aldrich, USA). A antigenicidade das quimeras foi verificada também por WB, a partir da reação com anticorpos de humanos naturalmente infectados (diluição 1:50) por *B. henselae*, cedidos pela UNICAMP (Campinas, Brasil).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas rQ1, rQ2 e rQ3 foram expressas na forma insolúvel por *E. coli* BL21 Star (DE3) e apresentaram o tamanho esperado, todas com $\sim$ 37 kDa. A confirmação da expressão se deu através de WB, com o reconhecimento das quimeras recombinantes no tamanho esperado, pelo anticorpo anti-6xHis (Fig. 1).

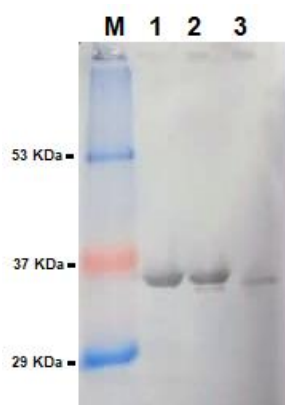


Figura 1: Confirmação da expressão das proteínas quiméricas rQ1, rQ2 e rQ3, produzida em *E. coli*, por *Western blotting* utilizando anticorpo anti-histidina. M: Marcador de peso molecular de Proteínas Pré Corado (Ludwig); 1: Proteína rQ1(37 kDa); 2: Proteína rQ2 (35 kDa); 3: Proteína rQ3 (37 kDa).

As quimeras mostraram-se funcionais e antigênicas, reagindo com anticorpos presentes no soro de pacientes naturalmente infectados, conforme evidenciado na Figura 2. A quimera rQ1 reagiu mais fracamente em comparação a rQ2 e rQ3.

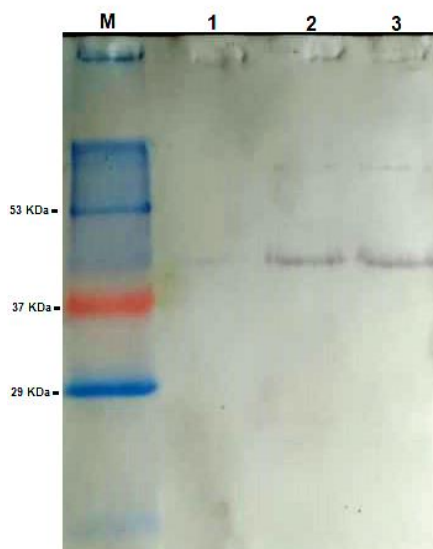


Figura 2: Avaliação da antigenicidade das quimeras rQ1, rQ2 e rQ3 produzidas em *E. coli*. Western blotting utilizando soro de humano naturalmente infectado por *B. henselae*. M: Marcador de peso molecular de Proteínas Pré Corado (Ludwig); 1: Proteína rQ1(37 kDa); 2: Proteína rQ2 (35 kDa); 3: Proteína rQ3 (37 kDa).

4. CONCLUSÕES

As proteínas rQ1, rQ2 e rQ3 foram expressas com sucesso no sistema procarioto *E. coli* e reconhecidas por anticorpos presentes no soro de humanos naturalmente infectados por *B. henselae*. Isto indica que a predição *in silico* de epítomos nas proteínas alvo, envolvidos na indução de resposta imunológica mediada por anticorpos, mostrou-se eficaz, visto que as proteínas quiméricas recombinantes reagiram com anticorpos produzidos contra as proteínas nativas durante a infecção natural. Assim, a aplicação das quimeras construídas indica ser promissora no desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico para *B. henselae*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGKASEKWINAI, N., ATKINS, E.H., ROMERO, S., GRIECO, J., CHUNG CHAO, C., CHING, W.M. An evaluation study of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant protein Pap31 for detection of antibody against *Bartonella bacilliformis* infection among the peruvian population. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 690-696, 2014.
- BREITSCHWERDT, E. Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. **Vet. Dermatol.**, v. 28, p. 96-e21, 2017.
- FERRARA, F., DI NIRO, R., D'ANGELO, S., BUSETTI, M., MARCARI, R., NOT, T., SBLATTERO, D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Bartonella henselae* infection detection. **Letters Applied Microbiol.**, v. 59, p. 253-262, 2014.

GIL, H., ESCUDERO, R., PONS, I., RODRIGUEZ-VARGAS, M., GARCÍA, E., RODRÍGUEZ-MORENO, I., et al. Distribution of *Bartonella henselae* variants in patients, reservoir hosts and vectors in Spain. **Plos One.**, v. 8, p. 1-10, 2013.

LITWIN, C.M., JOHNSON, J.M., MARTINS, T.B. The *Bartonella henselae* sucB gene encodes a dihydrolipoamide succinyltransferase protein reactive with sera from patients with cat-scratch disease. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1221-1227, 2004.

PENNISI, M.G., MARSILIO, F., HARTMANN, K., et al. *Bartonella* species infection in cats – ABCD guidessline on prevention and managment. **J. Fel. Med. Surg.**, v.15, p. 563-569, 2013.

REGIER, Y, O'ROURKE, F., KEMPF, V.A.J. *Bartonella* spp. – a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. **Parasites Vectors.**, v. 9, p. 1-12, 2016.

WERNER, J.A., FENG, S., KASTEN, R.W., HODZIC, E., CHOMEL, B.B., BARTHOLD, S.W. Cloning, characterization, and expression of *Bartonella henselae* p26. **Clin. Vac. Immunol.**, v. 13, p. 830-836, 2006.