

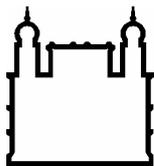
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS, BASEADAS EM
IMUNOTERAPIA, CONTRA INFECÇÕES POR *Acinetobacter* spp.

RENATA FAJARDO BONIN

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

RENATA FAJARDO BONIN

Identificação de Proteínas Imunogênicas para o Desenvolvimento de Estratégias, Baseadas em Imunoterapia, contra Infecções por *Acinetobacter* spp.

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

RIO DE JANEIRO

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B715

Bonin, Renata Fajardo.

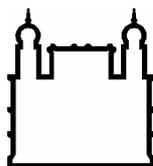
Identificação de proteínas imunogênicas para o desenvolvimento de estratégias, baseadas em imunoterapia, contra infecções por *acinetobacter* spp. / Renata Fajardo Bonin. – Rio de Janeiro, 2011. xviii, 79f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011. Bibliografia: f. 74-76

1. *Acinetobacter* spp. 2. Proteínas imunogênicas. 3. Imunoterapia. 4. Infecção hospitalar. I. Título.

CDD 579.3

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) e no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM), sob a orientação do Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna e da Dra Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

RENATA FAJARDO BONIN

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNOGÊNICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS, BASEADAS EM IMUNOTERAPIA, CONTRA INFECÇÕES POR *Acinetobacter* spp.

Orientadores: Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna
Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Dissertação aprovada em 30 de junho de 2011.

Examinadores:

Prof^o. Dr. José Godinho da Silva Júnior
Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ
Presidente da Banca

Dra. Marise Dutra Asensi
Instituto Oswaldo Cruz (IOC) / FIOCRUZ

Prof^a.Dra. Lucimar Gonçalves Milagres
Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Rio de Janeiro
2011

Ao meu marido Maurício, pelo incentivo e carinho e aos meus pais, Jorge e Cidinha, que sempre apoiaram minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À Bio-Manguinhos e ao diretor Artur Roberto Couto, pela oportunidade e condições propiciadas à realização do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos.

Ao orientador, Dr. José Procópio Moreno Senna, pela oportunidade, confiança, compreensão e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À orientadora, Dr^a Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Às companheiras de trabalho, Juliana Oliveira da Silva e Natália Plínio de Souza, pelo incentivo, paciência e ajuda durante estes dois anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. José Godinho da Silva Júnior pelas sugestões propostas na revisão da dissertação que contribuíram essencialmente para a versão final deste trabalho.

Ao Dr. Hilton Jorge do Nascimento pelo apoio e colaboração no desenvolvimento da eletroforese bi-dimensional.

A todos os colegas do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), pelo apoio, paciência e compreensão nestes dois anos de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) que me receberam com muito carinho.

À Dra. Sheila Farage, coordenadora do Mestrado em Tecnologia em Imunobiológicos, pelo incentivo e determinação.

À turma de 2009 do MPTI pelo apoio, paciência e ajuda durante todo este tempo.

Aos queridos amigos Marisol Simões, Talytha Feitosa, Michele Clarina e Francis Carazzai Residorfer pelo agradável convívio, pelas palavras de otimismo e pelo carinho.

À Andrea Ayrosa Lemos Tavares e Zaira Antunes Prado, pela ajuda durante estes dois anos de convivência no MPTI.

À equipe do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) pela colaboração na obtenção dos soros de camundongos.

Aos hospitais que disponibilizaram os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para viabilizar este trabalho.

Le microbe est rien, Le terrain c'est tout.

(O micróbio não é nada, o terreno é tudo)

Louis Pasteur

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Gênero <i>Acinetobacter</i>	19
1.2. Epidemiologia.....	21
1.3. Resistência aos antimicrobianos.....	23
1.3.1. Mecanismos de resistência.....	24
Produção de β -lactamases.....	24
Alteração de OMPs e PBPs.....	26
Bombas de Efluxo.....	26
1.4. Fatores de virulência e patogenicidade.....	27
1.5. Resposta imune contra bactérias extracelulares.....	29
1.6. Busca por novos alvos.....	31
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos Específicos.....	32

3. METODOLOGIA.....	33
3.1. Obtenção das cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i>	33
3.2. Análise da cinética de crescimento bacteriano das cepas de <i>A. baumannii</i>	34
3.2.1. Quantificação bacteriana.....	34
3.2.2. Expressão das proteínas.....	34
3.2.3. Quantificação de proteínas.....	35
3.3. Seleção da cepa ATCC19606.....	35
3.4. Extração das proteínas de superfície de <i>A. baumannii</i>	35
3.4.1. Extração das proteínas de membrana externa (OMPs).....	35
3.4.2. Extração das vesículas de membrana externa (OMVs).....	36
3.4.3. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
3.5. Identificação de proteínas imunogênicas em <i>A.baumannii</i> (Modelo Murino).....	36
3.5.1. Obtenção do soro de camundongos infectados por <i>A. baumannii</i>	36
3.5.2. Ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA).....	37
3.5.3. Análise da atividade neutralizante dos anticorpos anti- <i>A. baumannii</i>	38
3.5.4. Identificação das proteínas de superfície de <i>A. baumannii</i> por <i>Western Blot</i>	38
3.6. Identificação de proteínas imunogênicas em <i>A.baumannii</i> (Soro Humano).....	39
3.6.1.Obtenção dos soros de pacientes infectados ou colonizados por <i>Acinetobacter</i> spp.....	39
3.6.2. Identificação das proteínas de superfície de <i>A. baumannii</i> por <i>Western Blot</i>	40
3.6.3. Ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA).....	40
3.7. Análise das OMPs de <i>Escherichia coli</i> e <i>A.baumannii</i> por SDS-PAGE.....	41
3.8. Caracterização das proteínas imunogênicas por eletroforese bi-dimensional.....	41
3.8.1. Focalização isoeletrica.....	41

3.8.2. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%.....	41
3.8.3. Coloração das proteínas por impregnação com prata.....	42
3.8.4. Identificação das proteínas imunogênicas por <i>Western Blot</i>	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Cinética de crescimento de <i>Acinetobacter baumannii</i>	44
4.2. Expressão das proteínas de <i>A. baumannii</i>	45
4.3. Extração das proteínas e vesículas de membrana externa de <i>A.baumannii</i>	48
4.4. Identificação das proteínas imunogênicas em <i>A. baumannii</i> (Modelo murino).....	49
4.4.1. Anticorpos anti- <i>Acinetobacter</i> no soro de camundongos infectados.....	49
4.4.2. Atividade neutralizante do soro de camundongos infectados por <i>A. baumannii</i>	50
4.4.3. Caracterização Imunoquímica por <i>Western Blot</i>	50
4.5. Identificação das proteínas imunogênicas em <i>A. baumannii</i> (Soro Humano).....	52
4.5.1. Soros de pacientes infectados ou colonizados por <i>Acinetobacter</i> spp.....	52
4.5.2. Caracterização Imunoquímica por <i>Western Blot</i>	53
4.5.3. Anticorpos anti- <i>Acinetobacter</i> no soro de pacientes infectados.....	57
4.6. Análise das OMPs de <i>Escherichia coli</i> e <i>A.baumannii</i>	58
4.7. Caracterização das proteínas de <i>A.baumannii</i> por eletroforese bidimensional.....	58
4.8. Identificação das proteínas imunogênicas de <i>A.baumannii</i> por <i>Western Blot</i>	60
4.8.1. Reatividade das OMPs de <i>A. baumannii</i> com soros de camundongos infectados.....	60
4.8.2. Reatividade das OMPs de <i>A. baumannii</i> com soros de pacientes infectados.....	61
4.8.3. Reatividade das OMVs de <i>A. baumannii</i> com soros de pacientes infectados.....	63
5. DISCUSSÃO.....	65

5.1. Expressão das proteínas de <i>A. baumannii</i>	65
5.2. Análise dos soros de camundongos e pacientes infectados por <i>A. baumannii</i>	66
5.3. Comparação das OMPs identificadas através da reação com soros de camundongos e pacientes infectados por <i>A. baumannii</i>	67
5.4. Comparação das OMVs identificadas através da reação com soros de camundongos e pacientes infectados por <i>A. baumannii</i>	70
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.baumannii - *Acinetobacter baumannii*

ADCs – Cefalosforinases derivadas de *Acinetobacter*

ATCC - *American Type Culture Collection*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA - Albumina de soro bovino

°C - Grau Celsius (medida de temperatura)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

2D – Bidimensional

DO - Densidade ótica

DTT – Ditioneitol

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA – Ácido tetra-acético etilenodiamino

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay* – Ensaio imunoenzimático

ESBLs – β -lactamases de espectro estendido

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GE – *General Electrics Healthcare*

HCl - Ácido clorídrico

HRP – *Horseradish Peroxidase* – Enzima peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

ICS – Infecções na corrente sanguínea

IEF – Focalização Isoelétrica

IFF - Instituto Fernandes Figueira

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

IgA – Imunoglobulina do tipo A

IgG - Imunoglobulina do tipo G

IgM – Imunoglobulina do tipo M

IL-12 – Interleucina 12

IPEC - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
IPG – *Immobilized pH gradient*
IROMP – Proteína de membrana externa receptora de ferro
KDa - Kilodaltons – unidade de massa molecular
LAEAN - Laboratório de Experimentação Animal
LAMAM – Laboratório de Macromoléculas
LAPIH - Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LATER - Laboratório de Tecnologia Recombinante
LB - Luria Bertani (meio de cultura)
LPS – Lipopolissacarídeo
MALDI - *Matrix-assisted laser desorption-ionization*
MBLs – Metallo- β -lactamases
MDR - Multiresistente
MLST - *Multilocus Sequence Type*
MPTI - Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
NaCl - Cloreto de sódio
NNIS – *National Nosocomial Infections Surveillance*
NO – Óxido nítrico
OMPs – Proteínas de Membrana externa
OMVs – Vesículas de Membrana externa
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBPs – Proteínas de ligação à penicilina
PBS – Solução tampão fosfato de sódio
PBS-T - Solução tampão fosfato de sódio com Tween 20
PCR – Proteína C reativa
PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
pH - Potencial hidrogeniônico
pI–Ponto isoelétrico
q.s.p – Quantidade suficiente para
PM – Peso Molecular
RNA – Ácido ribonucléico
RPM - Rotação por minuto

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

SISNEP - Sistema Nacional de Ética e Pesquisa

Th₁ – Linfócito T *helper* responsável pela resposta imune celular

Th₂ – Linfócito T *helper* responsável pela resposta imune humoral

TMB - Tetrametilbenzidina

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TOF/ MS - *Time-of-flight mass spectrometry*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UTIs – Unidades de Terapia Intensiva

UV-VIS - Radiação ultravioleta - visível

USA - Estados Unidos da América

VDTEC - Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

VRE - *Enterococcus* resistente à vancomicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Microscopia Eletrônica de <i>Acinetobacter</i> spp.	20
Figura 1.2: Porcentagem de pacientes infectados por <i>Acinetobacter</i> spp. em diferentes regiões geográficas (Vincent et al., 2009).....	21
Figura 1.3: Distribuição de microrganismos isolados de ICS em pacientes de terapia intensiva notificados pelos hospitais brasileiros participantes da Rede RM – Julho de 2006 a Junho de 2008 (Rede RM- ANVISA/MS, CGLAB/MS, OPAS/OMS).	22
Figura 4.1: Gráfico comparando a cinética de crescimento das diferentes cepas de <i>A. baumannii</i> , através da medida da absorvância a 600nm em função do tempo de crescimento.	44
Figura 4.2: Gráfico comparando a cinética de crescimento das diferentes cepas de <i>A. baumannii</i> , através da medida da absorvância a 600nm em função do tempo de crescimento.	45
Figura 4.3: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das proteínas de <i>A. baumannii</i> na fase exponencial..	46
Figura 4.4: Análise densitométrica das bandas protéicas em gel de poliacrilamida 12% das cepas de <i>A. baumannii</i> na fase exponencial..	46
Figura 4.5: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das proteínas de <i>A. baumannii</i> na fase estacionária.....	47
Figura 4.6: Análise densitométrica das bandas protéicas em gel de poliacrilamida 12% das cepas de <i>A. baumannii</i> na fase estacionária.....	47
Figura: 4.7: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das OMPs e OMVs extraídas de <i>A. baumannii</i> (cepa ATCC19606).....	48
Figura 4.8: Curva de calibração para determinação dos pesos moleculares a partir do SDS-PAGE de padrões de proteínas de PM conhecidos (faixa 6.913 a 198.355).	49
Figura 4.9: Título de anticorpos anti- <i>Acinetobacter</i> no soro de camundongos infectados.	49
Figura 4.10: <i>Western blot</i> mostrando as OMPs e OMVs detectadas em <i>A. baumannii</i> através da reação com os soros de camundongos infectados.....	51

Figura 4.11: Curva de calibração para determinação dos pesos moleculares a partir da eletroforese de padrões de proteínas de PM conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355) em gel de poliacrilamida 12%, seguido de imunorevelação após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (<i>Western blot</i>).....	52
Figura 4.12: <i>Western blot</i> representativo das proteínas de membrana externa (OMPs) de <i>A. baumannii</i> reveladas com os soros de pacientes infectados.....	54
Figura 4.13: Gráfico representativo comparando as OMPs identificadas no soro de camundongos infectados que provavelmente foram reveladas com os soros de pacientes infectados por <i>Acinetobacter</i> spp.	54
Figura 4.14: <i>Western blot</i> representativo das OMVs <i>A. baumannii</i> reveladas com os soros de pacientes infectados.....	56
Figura 4.15: Gráfico representativo comparando as OMVs detectadas no soro de camundongos infectados que provavelmente foram reveladas com os soros de pacientes infectados por <i>Acinetobacter</i> spp.	56
Figura 4.16: Título de anticorpos anti- <i>Acinetobacter</i> no soro de pacientes infectados.....	57
Figura: 4.17: SDS-PAGE 12% das OMPs extraídas de <i>A. baumannii</i> e <i>E. coli</i>	58
Figura 4.18: OMPs da cepa ATCC19606 de <i>A. baumannii</i> separadas por eletroforese bi-dimensional na faixa de pI 3-10.	59
Figura 4.19: OMVs da cepa ATCC19606 de <i>A. baumannii</i> separadas por eletroforese bi-dimensional na faixa de pI 3-10.	59
Figura 4.20: <i>Western blot</i> das OMPs de <i>A. baumannii</i> que apresentaram reatividade com a mistura contendo soros de camundongos infectados por <i>A. baumannii</i>	60
Figura 4.21: <i>Western blot</i> , mostrando OMPs de <i>A. baumannii</i> que foram reveladas com o primeiro conjunto de 15 soros de pacientes infectados ...	62
Figura 4.22: <i>Western blot</i> , mostrando as OMPs de <i>A. baumannii</i> que foram reveladas com o segundo conjunto de 15 soros de pacientes infectados.	62
Figura 4.23: <i>Western blot</i> , mostrando as OMVs de <i>A. baumannii</i> que foram reveladas com um conjunto de 15 soros de pacientes infectados.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Espécies atualmente nomeadas pertencentes ao gênero <i>Acinetobacter</i>	19
Tabela 3.1: Características das cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> usadas no estudo.....	33
Tabela 4.1: Estimativa dos pesos moleculares das OMPs e OMVs extraídas de <i>A.baumannii</i> em relação a uma curva de calibração realizada com padrões de proteínas de PM conhecidos.	48
Tabela 4.2: Variação da concentração bacteriana (UFC/mL) em função do tempo na presença do soro de camundongo não infectado e do soro policlonal de camundongo infectado por <i>A. baumannii</i>	50
Tabela 4.3: Estimativa dos pesos moleculares, comparando as principais OMPs e OMVs detectadas no SDS-PAGE 12% que foram reveladas através da reação com o soro de camundongo infectado por <i>A. baumannii</i> , respectivamente.....	52
Tabela 4.4: Origem dos soros de pacientes infectados ou colonizados por <i>Acinetobacter</i> spp.	53
Tabela 4.5: Porcentagem das OMPs identificadas em pacientes infectados ou colonizados por <i>Acinetobacter</i> spp., considerando uma faixa de peso molecular com erro de até 5%.....	55
Tabela 4.6: Porcentagem das OMVs identificadas em pacientes infectados ou colonizados por <i>Acinetobacter</i> spp., considerando uma faixa de peso molecular com erro de até 5%.....	57
Tabela 4.7: As principais proteínas imunogênicas (OMPs) identificadas através da reação com o soro de camundongos infectados por <i>A.baumannii</i>	61
Tabela 4.8: As principais proteínas imunogênicas (OMPs) identificadas através da reação com os dois conjuntos de soros de pacientes infectados por <i>Acinetobacter</i> spp.	63
Tabela 4.9: As principais proteínas imunogênicas (OMVs) identificadas através da reação com os soros de pacientes infectados por <i>Acinetobacter</i> spp.	64

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno oportunista Gram-negativo que causa pneumonia, infecções do trato urinário e septicemia em pacientes imunocomprometidos. Este patógeno está freqüentemente associado a surtos nosocomiais em todo o mundo e tornou-se particularmente problemático no Brasil devido a sua prevalência e padrões de resistência a vários antimicrobianos. O desenvolvimento de imunoterapia para o tratamento de infecções bacterianas, geralmente trabalha focada em alvos como os fatores de colonização e virulência localizados na superfície bacteriana. Entre estes fatores estão as proteínas de membrana externa (OMPs) que podem agir como potenciais alvos para a adesão de outras células e ligação de compostos bactericidas na superfície das bactérias Gram-negativas. Além disso, *A. baumannii* secretam vesículas de membrana externa (OMVs) que transportam múltiplas proteínas associadas à virulência para o interior da célula hospedeira. Portanto, uma abordagem baseada na imunoproteômica foi desenvolvida para identificar proteínas imunogênicas na membrana externa de *Acinetobacter baumannii*, como possíveis alvos para o desenvolvimento de alternativas de tratamento com base na imunoterapia. Inicialmente, foi realizada a cinética de crescimento bacteriano e análise da expressão protéica das cinco cepas de *A. baumannii* por SDS-PAGE 12%. Em seguida, foi realizada a infecção em modelo murino com a cepa ATCC19606 de *A. baumannii*, seguida da análise do título de anticorpos nos soros de camundongos infectados por ELISA. A atividade neutralizante dos anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro dos camundongos infectados foi analisada através da variação da concentração bacteriana (UFC/mL) em função do tempo, na presença do soro de camundongo não infectado (controle negativo) e dos soros de camundongos infectados. Foram obtidos soros de pacientes infectados (n=50) por *Acinetobacter* spp. e o título de anticorpos nestes soros foi avaliado por ELISA. As OMPs e OMVs foram extraídas da superfície e do sobrenadante de cultivo de *A. baumannii* e as proteínas imunogênicas destas frações foram identificadas através da reação com os soros de camundongos e pacientes infectados através da técnica de *Western blot*, como triagem inicial, para posteriormente utilizar os soros positivos a fim de se obter uma melhor caracterização destas proteínas por eletroforese bi-dimensional. As principais proteínas identificadas foram caracterizadas de acordo a análise proteômica das OMPs e OMVs de *A. baumannii* realizada em estudos anteriores. Foi observado que as cinco cepas de *A. baumannii* apresentaram perfis semelhantes quanto às proteínas expressas. Portanto, a cepa padrão ATCC19606 de *A. baumannii* (DO=0,8) foi selecionada para continuar os estudos. Os camundongos responderam bem à infecção por *A. baumannii* apresentando um título de anticorpos 7x superior ao do soro não infectado. Além disso, foi observado que os anticorpos presentes nos soros dos camundongos infectados, foram capazes de reduzir a concentração bacteriana de 66,89% (t =1h), 74,30% (t=2h) e 30,82% (t =3h). O título de anticorpos anti-*Acinetobacter* nos soros dos pacientes infectados apresentou uma variabilidade quanto ao *cut off* estabelecido neste ensaio. Comparando os resultados obtidos através da revelação das OMPs e proteínas associadas às OMVs com os soros de camundongo e pacientes infectados, as principais proteínas imunogênicas localizadas na membrana externa de *A. baumannii* foram as Omp 38 da família Omp A, Omp 33 -36 kKa e a proteína receptora de sideróforo férrico (IROMP). Estas proteínas serão posteriormente melhor caracterizadas pelo método de MALDI-TOF/MS, através da análise de seus peptídeos gerados por hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an important opportunistic pathogen which causes pneumoniae, urinary tract infections and septicemia in immunocompromised patients. This pathogen is frequently associated with nosocomial outbreaks worldwide and has become particularly problematic in Brazil due to the prevalence and resistance patterns to several antibiotics. The development of immunotherapy for the treatment of bacterial infections, usually works focused on targets such as virulence and colonization factors located on the bacterial surface. Among these factors are the outer membrane proteins (OMPs) that may act as targets potential for adhesion of other cells and binding of compounds bactericidal on the Gram-negative bacteria surface. Furthermore, *A. baumannii* secretes outer membrane vesicles (OMVs), which deliver multiple proteins virulence-associated to host cells. Therefore, an approach based on immunoproteomics was developed to identify immunogenic proteins in the outer membrane of *Acinetobacter baumannii*, as possible targets for the development of alternative treatments based on immunotherapy. Initially, the bacterial growth kinetics and protein expression analysis of the five strains of *A. baumannii* by 12% SDS-PAGE was done. Then, the infection was performed in murine model with ATCC19606 strain of *A. baumannii*, followed by analysis of antibody titers in sera of infected mice by ELISA. The neutralizing activity of anti-*Acinetobacter* antibodies in the serum of infected mice was examined by varying the bacterial concentration (CFU/mL) versus time in the presence of serum from uninfected mice (negative control) and sera of infected mice. Sera from infected patients with *Acinetobacter* spp. (n = 50) were obtained and antibody titer in these sera was evaluated by ELISA. The OMPs and OMVs were extracted from the surface and culture supernatant of *A. baumannii* and immunogenic proteins of these fractions were identified by reaction with infected mouse and patients serum (n = 50) by *Western blot*, as initial screening. Subsequently, the positive serum were evaluated employing two-dimensional electrophoresis. The major proteins identified were classified according to proteomic analysis of the OMPs and OMVs *A. baumannii* performed in previous studies. In the present study was observed that the five strains of *A. baumannii* have similar profiles of proteins expression. Therefore, the standard strain ATCC19606 *A. baumannii* (OD 0,8) was selected for further studies. The mice immune response to infection by *A. baumannii* was consistent, showing an antibody titer 7x higher than the uninfected serum. In addition, antibodies present in sera of infected mice were able to reduce the bacterial concentration of 66,89% (t =1h), 74,30% (t=2h) e 30,82% (t =3h). The title of antibodies anti-*Acinetobacter* in sera of infected patients showed a variability in cut off set in this essay. Comparing the results obtained by development with infected mice and patients serum, the major immunogenic proteins located in the outer membrane of *A. baumannii* were the Omp 38 of the family Omp A, Omp 33 -36 kDa and ferric siderophore receptor (IROMP). These proteins will be best characterized subsequently by MALDI-TOF/MS method, through analysis of their peptides generated by enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Acinetobacter*

As bactérias do gênero *Acinetobacter* são cocobacilos Gram-negativos, não fermentadores, oxidase-negativa, imóveis e pertencem à família *Moraxellaceae* (Perez et al., 2007). Atualmente, já foram descritas 32 espécies taxonomicamente distintas, sendo a maioria delas organismos ambientais não associados com doenças em humanos (Gordon e Wareham, 2010). Entre estas espécies, 21 foram nomeadas (Tabela 1.1) com destaque para a espécie *Acinetobacter baumannii* que junto com as espécies genômicas 3 e 13 de Tjernberg e Ursing e a espécie *A. calcoaceticus* formam o “complexo *A. baumannii*” que é considerado de grande importância clínica, sendo responsável pela maioria dos surtos de infecções hospitalares envolvendo o gênero *Acinetobacter* (Towner, 2009).

Tabela 1.1: Espécies atualmente nomeadas pertencentes ao gênero *Acinetobacter*.

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter junii</i>
<i>Acinetobacter baylyi</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	<i>Acinetobacter parvus</i>
<i>Acinetobacter beijerinckii</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
<i>Acinetobacter bouvetii</i>	<i>Acinetobacter schindleri</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>
<i>Acinetobacter gernerii</i>	<i>Acinetobacter towneri</i>
<i>Acinetobacter guillouiae</i>	<i>Acinetobacter tandoii</i>
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	<i>Acinetobacter ursingii</i>
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Acinetobacter venetianus</i>
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	

Adaptado de Towner, 2009

Nos últimos anos, *A.baumannii* ganhou crescente notoriedade como um patógeno nosocomial devido ao surgimento de cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos, sendo responsável por uma gama variada de infecções como as do trato respiratório e urinário, circulação sanguínea, pele, tecidos moles e pneumonia associada à ventilação mecânica (Gordon e Wareham, 2010). As infecções causadas por este patógeno são frequentes em pacientes debilitados (imunocomprometidos), pacientes sujeitos a procedimentos invasivos e em tratamento com antibióticos de amplo-espectro. Sendo assim, as infecções devido a *A. baumannii* são frequentemente encontradas nas unidades de terapia intensiva (UTIs) (Perez et al., 2007; Towner, 2009).

O rápido surgimento e disseminação global de *A.baumannii*, demonstrou sua boa adaptação ao ambiente hospitalar (Gordon e Wareham, 2010). Estas bactérias têm a capacidade de aderir a plásticos, inclusive superfícies de cateteres, tubos endotraqueais e também são encontradas em fontes úmidas no ambiente hospitalar, tais como válvulas e circuitos de ventiladores mecânicos, umidificadores e leite humano proveniente de bancos de leite, o que colabora para sua sobrevivência e disseminação neste ambiente (Coordenadoria geral de vigilância em saúde, 2007).

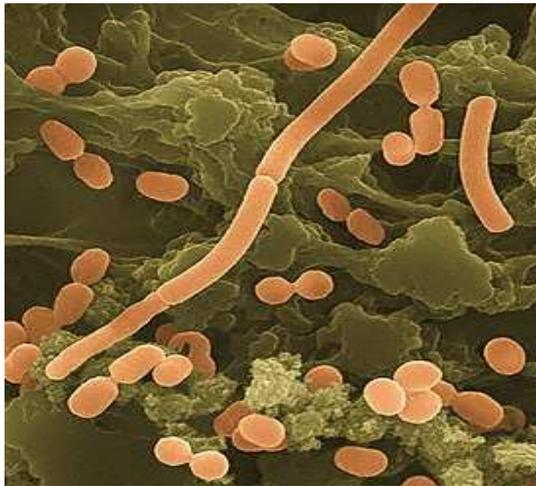


Figura 1.1 Microscopia Eletrônica de *Acinetobacter* spp.

A. baumannii também pode sobreviver em condições drásticas e durante os surtos tem sido detectado em vários locais envolvidos com o ambiente dos pacientes, incluindo lençóis, travesseiros, mobília e equipamentos hospitalares. Esta bactéria pode se disseminar através do ar, gotículas de água, pele dos pacientes que estão colonizados, mas a maneira mais comum de transmissão é através das mãos dos profissionais de saúde do hospital que interagem diretamente com os pacientes. Porém, a introdução do patógeno no ambiente hospitalar por indivíduos saudáveis também é possível, através de cepas que circulam na comunidade e provavelmente apresentam potencial epidêmico. Além disso, pacientes que estão colonizados ou infectados por *A. baumannii* podem carregar esta bactéria em diferentes sítios do corpo durante dias ou semanas (Dijkshoorn et al., 2007). Segundo a Coordenadoria geral de vigilância em saúde (2007), as culturas de materiais clínicos e os *swabs* de pele podem ser diagnosticados como negativos após o tratamento, porém os pacientes com doenças de base severas, com dispositivos invasivos e em uso de antimicrobianos, dificilmente são descolonizados mantendo-se portadores assintomáticos em risco de desenvolver nova infecção pelo mesmo germe e de transmitir para outros indivíduos.

1.2. Epidemiologia

As infecções hospitalares podem ser definidas como aquelas adquiridas após a admissão do paciente e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puderem ser relacionadas com a internação ou procedimentos hospitalares. As principais causas das infecções hospitalares estão relacionadas com a condição clínica do paciente, a utilização excessiva de procedimentos invasivos, o uso irracional de antimicrobianos, a falta de vigilância epidemiológica adequada e métodos de proteção anti-infecciosos ineficazes ou inexistentes (Gomes e Reis, 2003).

Acinetobacter spp. vem surgindo como um importante patógeno oportunista no mundo inteiro, sendo responsável por 2 a 10% de todas as infecções hospitalares, com alta incidência em unidades de tratamento intensivo (Gaynes e Edwards, 2005). Esta bactéria tem sido comparada ao *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e chamada de “MRSA Gram-negativa”. Embora o comportamento epidemiológico de *Acinetobacter* seja semelhante à MRSA, o impacto em termos de morbidade e mortalidade é menor do que o causado por *Staphylococci* coagulase-negativa (Guillou, 2005).

Em um estudo Internacional de Prevalência e Surto de Infecções nas Unidades de Terapia Intensiva foram coletadas amostras de pacientes no período de 24 horas em 75 países, nas quais foram detectadas a presença de infecções por *Acinetobacter* spp. em diferentes regiões geográficas (Vincent et al., 2009). A figura 1.2 mostra a distribuição geográfica de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp., segundo o estudo realizado por Vincent et al. (2009).

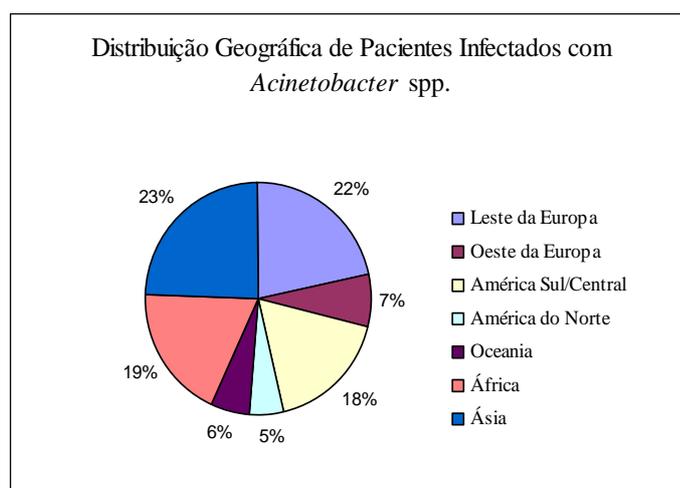


Figura 1.2: Porcentagem de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. em diferentes regiões geográficas (Vincent et al., 2009).

As infecções por *Acinetobacter* spp. incluem pneumonia nosocomial, meningite secundária, bacteremia, infecções de pele, tecidos moles, infecções do trato urinário e respiratório (Davis et al., 2005; Siroy et al., 2006). Dados do sistema “*National Nosocomial Infections Surveillance*” (NNIS), mostraram que entre os anos de 1975 e 2003 ocorreu um aumento das infecções causadas por *Acinetobacter* spp. em hospitais americanos. Este relato evidenciou aumento de 1,5% para 6,9% das pneumonias hospitalares, 1,8% para 2,4% das infecções da corrente sanguínea, 0,5% para 2,1% das infecções de sítios cirúrgicos e um aumento de 0,6% para 1,6% das infecções de trato urinário causadas por este agente (Mostachio, 2010).

No Brasil, foram coletados dados de 96 hospitais brasileiros no período de julho de 2006 a junho de 2008, os quais notificaram à Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana da ANVISA a ocorrência de infecções na corrente sanguínea (ICS) nas UTIs. Entre as 5.406 ICS notificadas, 11% corresponderam às infecções por *Acinetobacter* spp. (Figura 1.3).

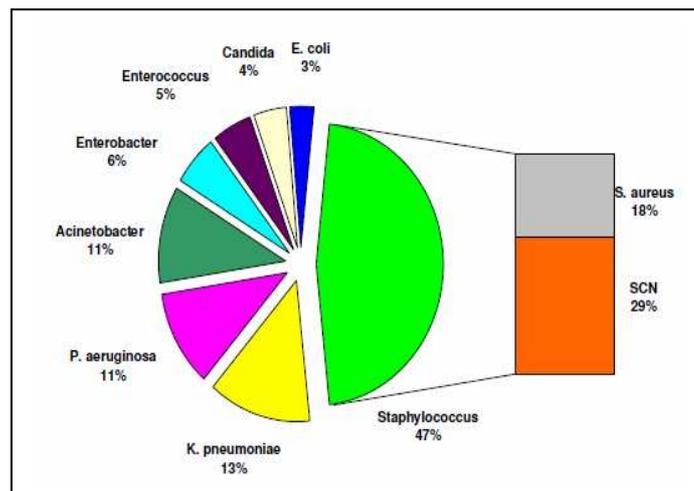


Figura 1.3: Distribuição de microrganismos isolados de ICS em pacientes de terapia intensiva notificados pelos hospitais brasileiros participantes da Rede RM – Julho de 2006 a Junho de 2008 (Rede RM- ANVISA/MS, CGLAB/MS, OPAS/OMS).

O surgimento de infecções por *Acinetobacter* spp. é favorecido por alguns fatores como a grande capacidade de adaptação deste patógeno às condições ambientais desfavoráveis, a utilização de uma variedade de fontes nutricionais, a adaptação às diferentes temperaturas, condições de salinidade e níveis de umidade, o que contribui para sua sobrevivência em ambiente hospitalar – que representa o principal reservatório desta bactéria (Bergogne e Towner, 1996). Além disso, uma característica importante de *Acinetobacter* spp.

é sua resistência aos agentes antimicrobianos, em especial aos β -lactâmicos, o que é uma vantagem no ambiente hospitalar (Falagas e Kopterides, 2006). Segundo dados da ANVISA (2008), *Acinetobacter* spp. apresentaram um perfil de resistência a vários antimicrobianos como piperacilina/tazobactam, ampicilina/sulbactam, ceftazidima, cefepime, carbapenêmicos (imipenem e meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacina e/ou levofloxacina) e aminoglicosídeos como a gentamicina e ampicacina.

O tratamento de cepas de *Acinetobacter* spp. resistente às múltiplas drogas geralmente é limitado aos carbapenêmicos, mas a emergência de cepas resistentes ao imipenem e meropenem é uma grande preocupação. Sendo assim, a disseminação global destes organismos enfatiza o potencial epidêmico deste patógeno (Jennifer et al., 2010).

1.3. Resistência aos antimicrobianos

Na década de 1990 e início do século 21, os principais patógenos resistentes detectados nos hospitais e centros de saúde na Europa e América do Norte foram os organismos Gram-positivos, tais como, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE). Assim, uma grande atenção foi dada a estes organismos e uma série de novas drogas foi desenvolvida para o seu tratamento (Jennifer et al., 2010).

Atualmente, *A. baumannii* está atraindo grande atenção devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos e o surgimento de cepas resistentes a praticamente todas as drogas disponíveis. Entre elas estão as aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cloranfenicol, β -lactâmicos de amplo espectro, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina. Existe uma preocupação especial quanto ao aparecimento de resistência aos carbapenêmicos principalmente, imipenem e meropenem, que foram introduzidas em 1985 e que, por anos, foram os agentes mais importantes para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multiresistente (Dijkshoorn et al., 2007).

A polimixina foi utilizada até o início de 1980 para tratar infecções causadas por bacilos Gram-negativos e apesar de ser um agente antimicrobiano altamente tóxico, está sendo novamente utilizada para tratar infecções por isolados de *Acinetobacter* susceptíveis a este composto (Carvalho et al., 2009). Porém, recentemente a resistência à polimixina e tigeciclina também foram relatadas, indicando que *A. baumannii* pode causar infecções que são totalmente refratárias ao arsenal de antimicrobianos atualmente disponíveis (Dijkshoorn et al., 2007).

1.3.1. Mecanismos de resistência

A resistência de *A. baumannii* aos agentes antimicrobianos é mediada por mecanismos que ocorrem na bactéria, incluindo modificações nos sítios alvos para antibióticos, inativação enzimática, efluxo ativo e redução do influxo de drogas (Dijkshoorn et al., 2007; Siroy et al., 2006). Atualmente, novas drogas estão em processo de desenvolvimento e aquelas que têm atividade contra bactérias Gram-negativas não apresentam nenhuma vantagem especial contra a multiresistência por isolados de *A. baumannii*, quando comparadas com os agentes antimicrobianos existentes (Tower, 2009). O surgimento e a propagação de cepas de *Acinetobacter* spp. multiresistentes têm sido cada vez mais relatados no mundo, o que limita as opções terapêuticas e faz necessária a busca por novas alternativas para combater as infecções causadas por este patógeno (Lin et al., 2008; Jones et al., 2007).

Produção de β -lactamases

Os mecanismos básicos de resistência aos β -lactâmicos são: hidrólise por β -lactamases; alterações na afinidade ou expressão de proteínas de ligação à penicilina (PBPs); alteração da estrutura e número de proteínas de membrana externa (OMPs) como as porinas que resultam na redução da permeabilidade dos antibióticos através da membrana externa do patógeno; a atividade das bombas de efluxo que diminuem a concentração de antibióticos na célula bacteriana (Perez et al., 2007; Peleg et al., 2008; Gussatti et al., 2009).

Os antimicrobianos β -lactâmicos inibem o crescimento das bactérias através do bloqueio da biossíntese da parede celular bacteriana. O mecanismo prevalente de resistência aos β -lactâmicos em *A. baumannii* ocorre através da produção de enzimas denominadas β -lactamases, cuja ação consiste em catalisar a hidrólise do anel β -lactâmico, tornando o antimicrobiano inativo. No entanto, de acordo com a natureza complexa deste organismo, mecanismos múltiplos, muitas vezes trabalham em conjunto para produzir o mesmo fenótipo de resistência (Peleg et al., 2008).

A resistência de *A. baumannii* às penicilinas, cefalosporinas e aztreonam é observada principalmente pela expressão de genes para β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), sendo estas enzimas inibidas pelo clavulanato. Além disso, todas as cepas de *A. baumannii* produzem uma cefalosporinase cromossomal do tipo C (*AmpC*), também conhecida como cefalosporinase derivada de *Acinetobacter* (ADCs), que não são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e o cefepime (Peleg et al., 2008; Perez et al., 2007).

Segundo Ambler et al. (1980), as β -lactamases são agrupadas em quatro classes

moleculares, A, B, C e D, baseadas na homologia da seqüência dos aminoácidos. As classes A, C e D são as serina β -lactamases que possuem serina no sítio ativo e a classe B são as metalo- β -lactamases (MBLs) que contém um ou dois íons zinco no sítio ativo (Queenan e Bush, 2007).

As carbapenemases são um grupo heterogêneo de β -lactamases do qual fazem parte a classe A (penicilinas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinas). Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar os antimicrobianos (imipenem e meropenem), além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas (Queenan e Bush, 2007).

As metalo- β -lactamases (MBLs) são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e todos os outros β -lactâmicos, com exceção do aztreonam e são resistentes à maioria dos inibidores de β -lactamases (Gordon e Wareham, 2010; Perez et al., 2007). Estas enzimas necessitam de zinco em seu sítio ativo para exercer sua função hidrolítica, portanto, na presença de EDTA (quelante de zinco) e outros cátions bivalentes perdem sua função (Queenan e Bush, 2007). O aumento do número de MBLs em *A. baumannii* contribuiu essencialmente para o surgimento global de resistência aos β -lactâmicos (Perez et al., 2007).

O modo mais comum de resistência enzimática aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é a produção de oxacilinas codificadas pelos genes das linhagens blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51 e blaOXA-58 (Carvalho et al., 2009). As enzimas da família OXA conferem resistência à ampicilina e cefalotina e são caracterizadas pela ação hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina, sendo fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (Gussatti et al., 2009). As oxacilinas de *A. baumannii* que pertencem ao grupo de enzimas OXA-51 são capazes de hidrolisar penicilinas (benzilpenicilina, ampicilina, ticarcilina e piperacilina) e carbapenêmicos, como o imipenem e meropenem (Gusatti et al., 2009). Esta resistência pode ser reforçada por mudanças na permeabilidade da membrana, devido à perda de proteínas de membrana externa (OMPs) que atuam como porinas para o transporte de substâncias através desta membrana. Portanto, a eficácia dos antimicrobianos carbapenêmicos para o tratamento de infecções por *Acinetobacter* está altamente comprometida devido ao surgimento das enzimas metalo- β -lactamases (MBLs) e oxacilinas (OXA) capazes de hidrolisar estes compostos, sendo que as carbapenemases do tipo OXA representam globalmente o principal mecanismo responsável pela resistência (Carvalho et al., 2009).

Alteração de OMPs e PBPs

As porinas são proteínas capazes de formar canais que permitem o transporte de moléculas através bicamada lipídica, da qual a membrana bacteriana é constituída. Estas proteínas de membrana externa (OMPs) podem agir como potenciais alvos para a adesão de outras células e ligação de compostos bactericidas na superfície da bactéria Gram-negativa. Variações estruturais destas proteínas têm surgido como mecanismo de resistência em resposta à presença de antibióticos, sendo uma estratégia de sobrevivência desenvolvida por muitas bactérias (Vila et al., 2007).

As porinas desempenham um papel chave na permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas, no entanto ainda existem poucos dados sobre estas proteínas nas espécies de *Acinetobacter*. Recentemente, uma OMP de 43KDa em *A. baumannii* foi identificada como homóloga a OprD de *P.aeruginosa*, caracterizada como uma porina associada à resistência ao imipenem. Uma outra proteína, uma porina de 29 KDa denominada CarO foi responsável pela resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos em *A. baumannii*. (Vila et al., 2007; Perez et al., 2007). *Acinetobacter baumannii* tem relativamente poucas porinas quando comparada a outras bactérias Gram-negativas, o que pode explicar em parte a resistência intrínseca aos antimicrobianos (Peleg et al., 2008).

As proteínas de ligação à penicilina (PBPs) presentes na membrana plasmática das bactérias, representam um sítio de ligação para os antibióticos β -lactâmicos. As PBPs podem ser alteradas através de mutações ou produzir PBPs suplementares, resultando na redução da afinidade pelos β -lactâmicos. Já foi relatado que a resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos pode estar associada à redução na expressão de PBP-2 (Perez et al., 2007).

Bombas de Efluxo

Os mecanismos de efluxo ativo responsáveis pela remoção da droga do local de ação, contribuem substancialmente para a resistência bacteriana a múltiplas drogas (Gordon e Wareham, 2010). A resistência aos antibióticos, como os carbapenêmicos, é frequentemente causada por alterações na permeabilidade da membrana devido à redução do influxo ou aumento do efluxo de drogas (Peleg et al., 2008).

Segundo Vila et al. (2007), atualmente os sistemas de efluxo são agrupados em seis famílias: Adenosine triphosphate binding cassette (ABC), major facilitator superfamily (MFS), resistance nodulation division (RND), multidrug and toxic compound extrusion (MATE), drug/metabolite transporter (DMT), small multidrug resistente (SMR).

O sequenciamento do genoma de uma cepa de *A. baumannii* multiresistente mostrou uma ampla variedade de sistemas de efluxo ativo como: a bomba AdeABC que pertence à família RND responsável pelo efluxo dos antimicrobianos β -lactâmicos (incluindo os carbapenêmicos), aminoglicosídeos, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, fluoroquinolonas; uma bomba da família MATE chamada AbeM que promove o efluxo de ciprofloxacino, norfloxacino, ofloxacino, gentamicina e as bombas Tet(A) e Tet(B) da família MFS que expulsam da células a tetraciclina e minociclina. A resistência de *A. baumannii* aos antimicrobianos mediada pelas bombas de efluxo está geralmente associada às famílias MFS e RND (Vila et al., 2007).

1.4. Fatores de virulência e patogenicidade

A virulência e patogenicidade de *Acinetobacter* spp. é pouco compreendida e controversa, sendo este organismo considerado uma bactéria de baixa virulência, apesar da severidade das infecções que ela causa. (Guillou, 2005).

A. baumannii se adere às superfícies biológicas e abióticas podendo formar biofilme. Esta é uma característica patogênica importante de muitas bactérias, facilitando a colonização de material prostético e contribuindo para a resistência às drogas e evasão do sistema imune do hospedeiro *in vivo*. O Pili e as fímbrias são importantes para a aderência inicial na superfície das células do hospedeiro, seguido pela produção de exopolissacarídeo, um importante constituinte do biofilme maduro que suprime a atividade dos neutrófilos e contribui para a resistência ao soro (Gordon e Wareham, 2010). Aproximadamente 30% das cepas de *Acinetobacter* produzem exopolissacarídeo que é um importante fator de virulência que protege a bactéria das defesas do hospedeiro, resultando em letalidade em camundongos e citotoxicidade pelas células patogênicas. (Guillou, 2005).

A capacidade de *A. baumannii* obter e utilizar recursos como o ferro é um fator importante para sua sobrevivência no hospedeiro e no ambiente, pois favorece o crescimento bacteriano e a expressão de virulência (Guillou, 2005). Este patógeno secreta uma variedade de moléculas envolvidas na absorção de ferro, incluindo sideróforos, acinetobactina e proteínas modificadoras dos receptores de ferro da membrana externa (Gordon e Wareham, 2010). O lipopolissacarídeo (LPS) produzido por *Acinetobacter* spp. e outros bacilos Gram-negativos é responsável pela toxicidade letal em camundongos, sendo esta endotoxina detectada durante a septicemia causada por esta bactéria. Este fator de virulência está envolvido na capacidade de resistência ao sistema complemento humano, permitindo a

sobrevivência da bactéria em fluidos humanos. O lipídeo A é geralmente formado por ácido esteárico, palmítico, mirístico, láurico ou capróico e representa a porção tóxica do LPS (Guillou, 2005). O potencial inflamatório do LPS de *A. baumannii*, como uma molécula central para o desenvolvimento de sepse, está sendo investigado e demonstrou ser um potente indutor da expressão de citocinas pró-inflamatórias nos monócitos humanos. Sendo assim, a capacidade deste patógeno em estimular a resposta inflamatória em monócitos humanos é provavelmente um fator significativo para a patogênese da infecção (Gordon e Wareham, 2010). O polissacarídeo capsular do LPS é outro fator conhecido por bloquear o acesso do complemento à parede celular bacteriana e impedir o desencadeamento da via alternativa de ativação do complemento, que é importante quanto à atividade bactericida (Guillou, 2005).

A maioria das bactérias Gram-negativas secreta vesículas de membrana externa (OMVs) durante o crescimento *in vitro* e nas infecções *in vivo*. As OMVs contêm lipopolissarídeos, proteínas de membrana externa, lipídeos de membrana externa, proteínas periplasmáticas, proteínas citoplasmáticas, DNA ou RNA. Os fatores de virulência presentes na superfície das OMVs permitem a aderência às células hospedeiras e a internalização dos componentes vesiculares. *A. baumannii* secretam OMVs durante o crescimento *in vitro* e já foram identificadas 26 proteínas de membrana externa diferentes presentes nesta bactéria que são derivadas de OMVs, como a AbOmpA responsável pela aderência e invasão de *A. baumannii* nas células epiteliais. Isto indica que as vesículas secretadas de *A. baumannii* atuam como um veículo para o transporte de moléculas efetoras (múltiplas proteínas associadas à virulência) para o interior das células hospedeiras (Kwon et al., 2009).

Sendo assim, a variação na expressão dos fatores de virulência envolvida pode diferir na capacidade das cepas em colonizar ou infectar o ambiente hospedeiro. Por exemplo, a acumulação de certas proteínas de membrana externa (OMPs) está associada com a habilidade para formar quantidades significativas de biofilme. Além disso, *A. baumannii* é capaz de invadir e promover a apoptose das células eucarióticas, uma propriedade atribuída à atividade da OmpA (Omp 36), que é transferida para a mitocôndria e núcleos e induzem as vias de morte celular eucariótica (Gordon e Wareham, 2010).

1.5. Resposta imune contra bactérias extracelulares

O conhecimento de que diferentes tipos de microrganismos são destruídos por diferentes componentes da resposta imune data do início dos anos 50, quando ficou documentada a importância dos anticorpos na destruição de bactérias extracelulares. Embora isoladamente os anticorpos por si só não tenham a capacidade de destruir bactérias, eles podem neutralizar os microrganismos, impedindo sua ligação com o tecido do hospedeiro. Adicionalmente, em associação com o complemento, os anticorpos podem lisar bactérias e funcionar como opsoninas, facilitando a fagocitose. Os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos exercem sua ação microbicida de forma mais ampla contra vários tipos de agentes e são células importantíssimas para a defesa do hospedeiro (Machado et al., 2004).

As bactérias extracelulares são capazes de se replicar fora das células do hospedeiro, por exemplo, na circulação, nos tecidos conjuntivos e em espaços teciduais tais como os lumens das vias aéreas e intestinais. Nesses casos os mecanismos de defesa estão relacionados principalmente com as barreiras naturais do hospedeiro, a resposta imune inata e a produção de anticorpos (Abbas e Lichtman, 2005).

A importância das barreiras naturais no combate às infecções bacterianas extracelulares é bem reconhecida. A integridade da pele e das mucosas impede a aderência e a penetração de bactérias; o movimento muco-ciliar elimina bactérias do trato respiratório; o pH ácido do estômago destrói bactérias que penetram pelo trato digestivo alto; e na saliva e secreções prostáticas existem substâncias com atividade antimicrobiana (Machado et al., 2004).

A participação da imunidade inata contra as bactérias extracelulares ocorre através das células fagocitárias, da ativação do sistema complemento pela via alternativa e da produção de quimiocinas e citocinas. Adicionalmente a proteína C reativa (PCR), proteína de fase aguda produzida principalmente por células hepáticas nas infecções bacterianas, exerce ação variada contra as bactérias. Ao ligar-se aos fosfolipídios de membrana de algumas bactérias a PCR atua como opsonina, facilitando a fagocitose por neutrófilos. A PCR também possui a capacidade de ativar o sistema complemento e estimular a síntese do fator de necrose tumoral (TNF- α), o qual induz a síntese de óxido nítrico (NO) e conseqüentemente a destruição de vários microrganismos. O complemento exerce seu papel de defesa pela ativação do complexo de ataque à membrana (C5-C9) e facilita a opsonização através do componente C3b. Todas as células da imunidade inata participam da defesa contra bactérias, embora seja enfatizado principalmente o papel de neutrófilos e monócitos/macrófagos pela capacidade

fagocítica dessas células (Machado et al., 2004).

A imunidade adaptativa, principalmente mediada por anticorpos, desempenha importante papel na defesa contra as bactérias extracelulares. Os anticorpos podem exercer suas ações de três maneiras: 1) opsonização, 2) ativando o sistema complemento, 3) promovendo a neutralização de bactérias ou de seus produtos (Machado et al., 2004). As respostas dos anticorpos às bactérias extracelulares são direcionadas contra antígenos da parede celular e toxinas secretadas e associadas à célula, os quais podem ser polissacarídeos ou proteínas (Abbas e Lichtman, 2005). Como as bactérias extracelulares são susceptíveis à destruição quando fagocitadas, elas desenvolvem como mecanismo de escape substâncias que possuem atividade antifagocítica. Anticorpos dirigidos contra essas substâncias não só impedem sua ação, mas facilitam a fagocitose desde que neutrófilos e macrófagos possuam receptor para a porção FC da imunoglobulina (opsonização). Os anticorpos também são coadjuvantes na destruição de bactérias por complemento, ativando esse sistema pela via clássica (Machado et al., 2004). Por meio do mecanismo de neutralização, os anticorpos principalmente a IgA e IgG, podem ligar-se a bactérias e com isso, impedir que as mesmas se fixem nas mucosas, como no trato intestinal e no trato respiratório. Os anticorpos em muitas ocasiões se ligam a toxinas produzidas por bactérias neutralizando a ação desses produtos. A opsonização é mediada por algumas subclasses de IgG e a ativação do complemento pela IgM e subclasses de IgG (Abbas e Lichtman, 2005). Os antígenos protéicos das bactérias extracelulares também ativam as células T auxiliares CD4⁺, as quais produzem citocinas que estimulam a produção de anticorpos, induzem a inflamação local (fator de necrose tumoral-TNF) e acentuam as atividades fagocítica e microbicida dos macrófagos com o interferon- γ (Machado et al., 2004).

As células da resposta imune são também as principais fontes de citocinas e quimiocinas no início das infecções, as quais exercem sua ação tanto na fase inata como na adaptativa. As quimiocinas, devido a seu papel de atrair células para o sítio da lesão, são muito importantes no processo de defesa do hospedeiro. Entre as várias citocinas que participam da defesa contra bactérias tem sido dado destaque às citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , interleucinas 1 e 6. Essas citocinas são produzidas nas fases iniciais da infecção e são responsáveis por meio de sua ação no hipotálamo pelo aparecimento da febre e também pela inibição da multiplicação bacteriana. Elas aumentam a expressão das moléculas de adesão, facilitando a passagem de células do vaso para o sítio da infecção, e também estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem NO que é capaz de destruir as bactérias

(Machado et al., 2004). Outras citocinas produzidas nas fases iniciais da infecção interferem na resposta imune adaptativa, como a IL-12, produzida por macrófagos, que tem papel importante na diferenciação de células Th0 para Th1, enquanto a IL-4, produzida por basófilos, mastócitos e macrófagos, estimula a diferenciação de células Th0 para Th2, que vão colaborar com o linfócito B na produção de anticorpos (Machado et al., 2004).

As principais conseqüências da resposta imune contra bactérias que são prejudiciais ao hospedeiro são a inflamação e o choque séptico, os quais ocorrem devido a citocinas produzidas principalmente por macrófagos ativados. O choque séptico é a conseqüência patológica mais grave desencadeado por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede das bactérias Gram-negativas, estimulando nos neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e músculos uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) e NO. Como conseqüência, há diminuição do tônus muscular e do débito cardíaco, que resulta em hipotensão e má perfusão tecidual, e finalmente morte celular (Machado et al., 2004).

1.6. Busca por novos alvos

A imunoterapia consiste no tratamento e imunoprevenção de doenças através da indução, estimulação ou supressão da resposta imune (Abbas e Lichtmann, 2005). *Acinetobacter baumannii* é um importante patógeno oportunista Gram-negativo freqüentemente associado a surtos nosocomiais em todo o mundo (Villegas e Hartstein, 2003). Este patógeno tornou-se particularmente problemático no Brasil devido a sua prevalência e padrões de resistência a vários antimicrobianos (Carvalho et al., 2009). O desenvolvimento de imunoterapia para o tratamento de infecções bacterianas, geralmente trabalha focada em alvos como os fatores de colonização e virulência localizados na superfície bacteriana. Entretanto, poucos estudos avaliam o grau de imunogenicidade conferido por estes alvos em situações reais de infecção, ou seja; no confronto patógeno *versus* hospedeiro. Desta forma, em virtude das características deste patógeno - em especial da dificuldade de tratamento com antimicrobianos convencionais - o desenvolvimento de novas estratégias de eliminação e controle desta bactéria são de alta relevância. Portanto, isto justifica a importância de se realizar uma análise imunoproteômica com o objetivo de identificar proteínas imunogênicas na membrana externa de *Acinetobacter* spp., que posteriormente contribuirão para o desenvolvimento de alternativas de tratamento baseadas na imunoterapia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho consiste na identificação de proteínas imunogênicas para o desenvolvimento de estratégias baseadas em imunoterapia contra infecções por *Acinetobacter* spp.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a cinética de crescimento bacteriano e a expressão de proteínas entre as diferentes cepas de *A. baumannii* crescidas nas fases exponencial e estacionária;
- Extrair as proteínas de membrana externa (OMPs) e as proteínas associadas às vesículas de membrana externa (OMVs) de *A. baumannii*;
- Analisar o título de anticorpos nos soros dos camundongos infectados por *A. baumannii* através de ensaio imuno-enzimático (ELISA);
- Analisar a atividade neutralizante dos anticorpos anti-*A. baumannii* nos soros dos camundongos infectados;
- Analisar o título de anticorpos nos soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp. através de ensaio imuno-enzimático (ELISA);
- Identificar as OMPs e OMVs de *A. baumannii*, através da técnica de *Western Blot*, a partir da incubação com soros de camundongos infectados e pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp.;
- Caracterizar as proteínas imunodominantes por eletroforese bi-dimensional (2D), seguido de *Western blot*.
- Comparar os resultados obtidos a partir da incubação com os soros de camundongos e pacientes infectados.

3. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) e no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ).

3.1. Obtenção das cepas de *Acinetobacter baumannii*

Para a realização do atual estudo foram obtidas quatro cepas de *A.baumannii* isoladas a partir de material clínico (tabela 3.1) e uma cepa padrão (ATCC19606), previamente confirmadas taxonomicamente. Estas cepas bacterianas foram cedidas da subcoleção de culturas de bactérias de origem hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) pela Dra Marise Dutra Asensi e Dra Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH/IOC), situado no Rio de Janeiro – RJ.

Tabela 3.1: Características das cepas clínicas de *A. baumannii* usadas no estudo

Nº da Cepa	Fenótipo de Resistência	PFGE	MLST	Origem
305LGB	AK, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, SXT	A	131	Rio de Janeiro
356LGB	AK, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, SXT	B	133	Rio de Janeiro
539LGB	AK, SAM, TZP, ATM, CAZ, FEP, CIP, IPM, MER, SXT	C	132	Rio de Janeiro
549LGB	ATM	P	*	Rio de Janeiro

AK: amicacina; SAM: Ampicilina+sulbactam; TPZ: Piperacilina+tazobactam; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacino; IPM: Imipenen; MER: Meropenen; SXT: Sulfametazaxol+ trimetoprima. * Não determinado. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE); *Multilocus Sequence Type* (MLST).

O atual projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC) na FIOCRUZ (Anexo 1). Este trabalho está cadastrado no Sistema Nacional de Ética e Pesquisa (SISNEP), pelo registro FR-313927 de 12/01/2010.

3.2. Análise da cinética de crescimento bacteriano das cepas de *A. baumannii*

A cinética de crescimento das cinco cepas de *A. baumannii* foi analisada através da utilização de pré-inóculos em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (10g/L bacto-triptona 5g/L, extrato de levedura e 5g/L NaCl) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina e cultivados durante 16-18h, a 37°C, sob constante agitação de 120 rpm (*Incubator Shaker Series – INNOVA® 44*). Estes pré-inóculos foram colocados em Erlenmeyers (250mL) com meio LB na proporção de 1:100 (v/v), submetidos à agitação de 120 rpm a 37°C. A leitura da densidade ótica das culturas bacterianas a 600 nm foi realizada em diferentes intervalos de tempos, utilizando o espectrofotômetro UV1203 (*Shimadzu*). Dessa forma, foi analisado o crescimento bacteriano das cinco cepas estudadas em função do tempo (Soares et al., 2009).

3.2.1. Quantificação bacteriana

A quantificação bacteriana foi realizada da seguinte forma: foi retirada uma alíquota de 100µL das culturas referentes a cada cepa de *A. baumannii* em diferentes densidades óticas. Estas alíquotas foram diluídas a 1:10⁻⁶(v/v), 1:10⁻⁷(v/v), 1:10⁻⁸(v/v) em meio LB líquido e em seguida, 100µL correspondente a cada diluição foram semeados em placas de Petri contendo o meio sólido Agar Luria Bertani suplementado com ampicilina 100µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C durante 12 horas. As colônias obtidas foram quantificadas para definir a concentração de bactérias (UFC/mL).

3.2.2. Expressão das proteínas

As proteínas expressas nas cinco cepas de *A. baumannii*, nas fases exponencial ($DO_{600nm}=0,8$) e estacionária foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE a 12%), em cuba vertical Mini Protean III (Bio-Rad), segundo Laemmli (1970). As proteínas presentes na bactéria íntegra (15µg) foram dissolvidas em solução tampão de amostra contendo SDS 10%, 2-mercaptoetanol 2,5% (v/v), glicerol 25% (v/v), Tris.HCl 0,5M pH 6.8 e azul de bromofenol 0,5% (m/v). Para a determinação do peso molecular das proteínas utilizou-se o padrão de proteínas coradas de pesos moleculares conhecidos (miosina 198.355; β-galactosidade 131.098; albumina de soro bovino 82.699; anidrase carbônica 40.435; inibidor de tripsina 31.341; lisozima 17.180; aprotinina 6.913). A eletroforese foi realizada durante 90 minutos a 120 volts e as bandas protéicas foram reveladas com a solução corante *Coomassie brilliant blue R 250* (0.2 g %) em água: metanol:

ácido acético (30:8: 62 v/v/v). O gel foi descorado com solução de metanol: ácido acético: água (30:8: 62, v/v/v) (Silva Jr., 2001).

3.2.3. Quantificação de proteínas

A estimativa da concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) nas amostras foi realizada de acordo com o método de Folin - Lowry modificado por Peterson (1983), usando-se a albumina de soro bovino (BSA) 10mg/mL como padrão.

3.3. Seleção da cepa ATCC19606

As cinco cepas de *A. baumannii* analisadas anteriormente por SDS-PAGE 12%, apresentaram perfis eletroforéticos muito parecidos em relação às proteínas expressas pela bactéria. Sendo assim, selecionamos a cepa padrão ATCC19606 na fase exponencial para continuarmos o estudo.

3.4. Extração das proteínas de superfície de *A. baumannii*

3.4.1. Extração das proteínas de membrana externa (OMPs)

A extração das proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. baumannii* foi realizada de acordo com Kittelberger et al. (1995). A cepa ATCC19606 de *A. baumannii* foi cultivada em caldo de Luria-Bertani (LB) até atingir a densidade ótica igual a 0,8, conforme descrito anteriormente no item 3.2. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm / 4°C durante 15 minutos e o *pellet* foi lavado 2 vezes com PBS (solução tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,2). Para cada 50 mg do *pellet* obtido foi adicionado 500 μL de solução (TBS: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) contendo Triton® X-114 4% (Sigma – Aldrich®, USA). A mistura foi agitada durante 16-18h a 4°C e depois, centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C (*Centrifuge 5415D*). O sobrenadante foi incubado a 37°C durante 3 horas para separar as fases aquosa e detergente. A fase detergente foi coletada e realizou-se a precipitação protéica com adição de acetona pura (1:1, v/v) a frio, seguida de incubação durante 3 horas a 4°C. A amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos a 37°C, o sobrenadante foi descartado e a acetona evaporada a 37°C.

3.4.2. Extração das vesículas de membrana externa (OMVs)

As vesículas de membrana externa (OMVs) foram isoladas do sobrenadante da cultura bacteriana, segundo Kwon et al. (2009). A cepa ATCC19606 de *A. baumannii* foi cultivada em caldo de Luria-Bertani (LB) até atingir a densidade ótica igual a 0,8, conforme descrito anteriormente no item 3.2. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm / 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado (filtro de millipore 0,22µm) para remover os debris e células residuais e depois, concentrado a vácuo (Eppendorf Vacufuge™). A precipitação das proteínas foi realizada com adição de acetona pura (1:1, v/v) a frio, seguida de incubação durante 16-18 horas. A amostra foi centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a acetona evaporada a 37°C.

3.4.3. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas de membrana externa (OMPs) e as vesículas de membrana externa (OMVs) extraídas de *A. baumannii* foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE a 12%), segundo Laemmli (1970). Cerca de 20µg de OMPs e 40 µg de OMVs foram submetidas ao SDS-PAGE, conforme a metodologia descrita anteriormente no item 3.2.2.

3.5. Identificação de proteínas imunogênicas em *A.baumannii* (Modelo Murino)

3.5.1. Obtenção do soro de camundongos infectados por *A. baumannii*

A obtenção de anticorpos contra as proteínas da membrana externa de *A. baumannii* (ATCC19606) foi realizada através de infecção em modelo murino. Este experimento foi realizado com a colaboração do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN/ Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ). A infecção foi realizada utilizando 10 camundongos BALB/C (*Mus musculus*) com 8 semanas de vida e com peso de cerca de vinte gramas. Primeiramente, o soro não infectado foi coletado a partir do plexo orbital destes animais (controle negativo). Após 24 horas, foi realizada a primeira infecção da seguinte forma: a cepa ATCC19606 de *A. baumannii* foi cultivada até a densidade ótica equivalente a 0,4 a 600nm. Em seguida, 100µL desta cultura foi diluída em PBS estéril 1:10 (v/v) e foi retirado 50µL desta solução ($2,0 \times 10^6$ UFC) para infectar os camundongos com esta bactéria íntegra por via intraperitoneal. Após sete dias, foi realizada a segunda infecção de acordo com o protocolo da primeira infecção. Uma semana após a segunda infecção, os soros infectados foram coletados a partir do plexo orbital e punção cardíaca. Em seguida, os soros dos 10 camundongos infectados por *A.*

baumannii foram misturados e armazenados a -20 °C.

O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ e está cadastrado com o seguinte registro: P-47/ 2010-3 (Anexo 2).

3.5.2. Ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA)

O ensaio de ELISA indireto foi realizado para analisar o título de anticorpos no soro de camundongos após a infecção por *A. baumannii*. O soro de camundongo não infectado por esta bactéria foi utilizado como controle negativo.

A preparação contendo a cepa ATCC19606 de *A. baumannii* íntegra, equivalente a DO=0,8, foi utilizada como antígeno no ensaio imuno-enzimático. De uma forma geral, aproximadamente $3,6 \times 10^7$ UFC foram diluídas em 100µL de uma solução do tampão carbonato e bicarbonato de sódio 0,016 M e 0,034 M, respectivamente, pH 9,0 e foram adicionadas aos poços da microplaca Nunc Maxisorp (*Apogent*, USA) para adsorção dos antígenos alvo. Após o período de 18 horas de incubação a 4°C, foram efetuadas três lavagens com PBS-T (solução tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,05%, pH 7,2) para a retirada do material não adsorvido. O bloqueio dos sítios não-específicos da microplaca foi realizado com 200µL PBS-Milk 5% (solução tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2 com leite desnatado a 5%). Após um período de incubação de 2 horas a 37°C, procedeu-se uma nova lavagem com PBS-T para a retirada do material não adsorvido nesta etapa da reação. Em seguida, adicionou-se aos poços da microplaca 100µL do soro de camundongo não infectado (controle negativo) e da mistura contendo os soros de camundongos infectados (n=10), ambos diluídos em PBS-milk 5% nas concentrações de 1:100 (v/v) a 1:25600 (v/v).

Após um período de incubação de 2 horas a 37°C, efetuou-se uma nova lavagem com PBS-T. Posteriormente, adicionou-se aos poços da microplaca 100µL da solução de *anti-mouse* IgG conjugada à peroxidase marcado com HRP (*Promega*, USA) diluída 1:10.000 (v/v) em PBS-Milk 5% e procedeu-se a incubação por 90 minutos a 37°C. Uma nova lavagem, com PBS-T, foi realizada para a retirada do conjugado não fixado. Em seguida, foi adicionado aos poços da microplaca, 100µL da solução contendo o substrato (H₂O₂ a 10%) e o cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina 1%, *Bio-Rad*), para revelação do ensaio por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, a reação foi interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. As densidades óticas foram determinadas

em duplicata a 450 nm, utilizando um leitor de microplaca TP-reader (*Thermoplate*, USA). O *cut off* estabelecido neste ensaio corresponde ao título de anticorpos no soro dos camundongos infectados por *A.baumannii* que apresentou densidade ótica 3 vezes superior ao do soro não infectado (controle negativo).

3.5.3. Análise da atividade neutralizante dos anticorpos anti- *A. baumannii*

O ensaio da atividade neutralizante dos anticorpos anti-*A. baumannii* foi realizado através da análise da variação da concentração bacteriana (UFC/mL) em função do tempo, na presença do soro de camundongo não infectado (controle negativo) e da mistura contendo soros de camundongos infectados (n=10) com a cepa ATCC19606 de *A. baumannii*, de acordo com o método proposto por Russo et al. (2008). Foi realizada a inativação do complemento, através da incubação dos soros de camundongos utilizados neste ensaio, a 56°C durante 30 minutos. O crescimento da cepa ATCC19606 de *A. baumannii* foi realizado através da utilização do pré-inóculo contendo meio de cultura Luria-Bertani (LB) (10g/L bacto-triptona, 5g/L, extrato de levedura e 5g/L NaCl) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina e cultivados durante 16-18h, a 37°C, sob constante agitação de 120rpm (*Incubator Shaker Series – INNOVA® 44*). No dia seguinte, o pré-inóculo foi diluído 1:100 (v/v) em meio LB, submetido à agitação de 120rpm a 37°C até atingir a densidade ótica igual a 0,4 a 600nm e obter um inóculo inicial de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Então, 1×10^5 UFC foram adicionadas a 900µL de soro de camundongo não infectado e a 900µL da mistura contendo os soros de camundongos infectados (n=10) por *A. baumannii*, respectivamente e em seguida, submetidos à agitação de 120rpm a 37°C. Alíquotas de 100µL da cultura bacteriana na presença dos soros de camundongo não infectado e infectado foram coletadas no tempo zero (inóculo) e após 1, 2 e 3 horas de agitação. Estas alíquotas foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo o meio sólido ágar Luria-Bertani suplementado com ampicilina 100µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C durante 12 horas e as colônias obtidas foram quantificadas para definir a concentração de bactérias (UFC/mL).

3.5.4. Identificação das proteínas de superfície de *A. baumannii* por *Western Blot*

Os antígenos (OMPs e OMVs) de *A. baumannii* contendo cerca de 20µg e 40µg de proteínas respectivamente, foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poli-acrilamida a 12% e posterior transferência a 70V para membranas de nitrocelulose de tamanho 8 x 6,5cm com poro de 0,22 µm (Bio-Rad, USA), através de um sistema de

transferência vertical (Bio-Rad, USA), segundo Towbin et al. (1979). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução TBS (Tris-HCl 25mM pH 8,0; NaCl 0,15mM) contendo leite em pó desnatado 10% e albumina bovina 1% (BSA), sob agitação à temperatura ambiente durante 2 horas. As membranas foram incubadas a 37°C durante 12 horas com a mistura contendo os soros de camundongos infectados (n=10) com a cepa ATCC19606 de *A. baumannii* e com o soro de camundongo não infectado, ambos na diluição 1: 200 (v/v), utilizando a mesma solução tampão de bloqueio. O soro de camundongo não infectado foi utilizado como controle negativo. As lavagens foram feitas com solução de Tween 20 (0,05%) em TBS após cada etapa de incubação. Em seguida, as membranas foram tratadas com um conjugado anti-*mouse* IgG marcado com fosfatase alcalina ((Sigma – Aldrich®, USA) na diluição 1:15.000 (v/v) em solução TBS contendo BSA 1% por 3 horas. Finalmente, as bandas foram reveladas com a adição do reagente de cor *Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* (Promega, USA) por reação com dimetilformamida até a identificação visual das bandas. A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.6. Identificação de proteínas imunogênicas em *A.baumannii* (Soro Humano)

3.6.1. Obtenção dos soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp.

Os soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp. (n=50) foram coletados no período de outubro de 2009 a dezembro de 2010, a partir dos seguintes centros de saúde: Hospital Samaritano e Amparo (Laboratório Richet) - RJ; Hospital de Pronto Socorro (HPS) - RS, Instituto Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ) - RJ, Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) - RJ; Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) - RJ. A identificação das amostras infectadas por *Acinetobacter* spp. foi realizada pelo serviço de bacteriologia dos hospitais, através do método automatizado *Microscan WalkAway* (Dade Behring) ou Vitek 2 (Biomerieux).

Foram obtidos dois soros de recém-nascidos não infectados por *Acinetobacter* spp. que participaram do estudo como controle negativo. Os soros foram armazenados a -20°C. As amostras coletadas foram devidamente registradas e os dados referentes à identidade dos pacientes mantidos em sigilo, sendo os mesmos identificados por códigos. O atual trabalho está cadastrado no Sistema Nacional de Ética e Pesquisa (SISNEP), pelo registro FR-313927 de 12/01/2010. O projeto foi novamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Antônio Pedro (Anexo 3).

3.6.2. Identificação das proteínas de superfície de *A. baumannii* por *Western Blot*

A identificação das proteínas de membrana externa (OMPs) e vesículas de membrana externa (OMVs) de *A.baumannii* foi realizada por *Western Blot*, segundo o protocolo descrito anteriormente no item 3.5.4, inserindo algumas modificações. As membranas contendo os antígenos (OMPs e OMVs) foram individualmente incubadas com 50 soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp. e com o soro de recém-nascido não infectado por este patógeno (controle negativo), ambos na diluição 1:200 (v/v), em solução de TBS contendo leite em pó desnatado 10% e albumina bovina 1%. O conjugado usado foi anti-humano IgG marcado com fosfatase alcalina (Sigma – Aldrich®, USA) na diluição 1:15.000 (v/v) em solução TBS contendo BSA 1% por 3 horas. O reagente de cor utilizado foi o *Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* (Promega, USA).

3.6.3. Ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA)

O ensaio de ELISA indireto foi realizado para analisar o título de anticorpos nos soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp., de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 3.5.2, incluindo algumas alterações. A preparação contendo a cepa ATCC19606 de *A. baumannii* íntegra, equivalente a DO=0,8, foi utilizada como antígeno no ensaio imuno-enzimático e o soro de recém-nascido não infectado por *Acinetobacter* spp. foi usado como controle negativo. Os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. e o soro não infectado foram analisados nas concentrações de 1:200 (v/v) a 1:12800 (v/v). Os soros dos pacientes infectados que apresentaram reação mais intensa com as proteínas de membrana externa no *Western blot* realizado com um total de 50 soros, foram selecionados para este ensaio (n=31). O anticorpo secundário usado foi o IgG anti-humano conjugado à peroxidase marcado com HRP (Promega, USA) diluído 1:10.000 (v/v) em PBS-Milk 5% e para a revelação do ensaio foi adicionado à solução contendo o substrato (H₂O₂ a 10%) e o cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina 1%, Bio-Rad). A reação foi interrompida com a adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N e as densidades óticas foram determinadas em duplicata a 450 nm, utilizando um leitor de microplaca TP-reader (*Thermoplate*, USA). O *cut off* estabelecido neste ensaio corresponde ao título de anticorpos no soro dos pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. que apresentou densidade ótica 3 vezes superior ao do soro não infectado (controle negativo).

3.7. Análise das OMPs de *Escherichia coli* e *A.baumannii* por SDS-PAGE

A comparação entre as proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* e *A. baumannii* foi realizada para investigar a possibilidade de reação cruzada entre estas bactérias Gram negativas, já que a *E.coli* é o bacilo Gram-negativo aeróbio mais freqüente presente na microbiota humana. Sendo assim, as OMPs de *E.coli* e *A. baumannii* foram extraídas utilizando o protocolo descrito no item 3.4.1 e cerca de 20µg de proteína, de ambas as bactérias, foram analisadas por SDS-PAGE a 12%, segundo Lämmli (1970), conforme a metodologia descrita anteriormente no item 3.2.2.

3.8. Caracterização das proteínas imunogênicas por eletroforese bi-dimensional

3.8.1. Focalização isoeétrica

As proteínas de membrana externa (OMPs) e as vesículas de membrana externa (OMVs) foram analisadas por eletroforese bi-dimensional (2D), segundo Lopéz (2007) e Kurupati et al. (2006). As tiras de IPG de 7cm com gradiente de pI 3-10 (Bio-Rad, USA) foram incubadas durante 12-18 horas com 125µL de solução de rehidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, Triton x-100 0,5% (v/v), anfólitos 3-10 0,5% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v) e DTT 40mM) contendo 60µg de OMPs e 120µg de OMVs, utilizando o suporte IPGbox (GE Healthcare). A focalização isoeétrica foi realizada em três etapas (500V por 1h, 2.000V por 1h e 8.000V por 2hs) a 20°C e 50µA, usando o sistema IPGphor III (GE Healthcare, EUA). Após a focalização isoeétrica, as tiras IPG foram equilibradas durante 15 minutos em 10mL de solução (Tris-Cl 50mM pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 1% (p/v).

3.8.2. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%

A segunda dimensão foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE a 12%), segundo Lämmli (1970). Após equilibradas, as tiras anteriormente submetidas à focalização isoeétrica foram transferidas para o gel de 1,5mm e cobertas com solução de agarose 0,5%. A eletroforese foi realizada a 15mA/gel nos primeiros 15 minutos e em seguida, 30mA/gel a 120 volts até a solução tampão de amostra atingir o final do gel, em cuba vertical Mini-Protean®II (Bio-Rad Laboratories, USA). Para a determinação do peso molecular das proteínas utilizou-se o padrão de proteínas coradas de pesos moleculares conhecidos (miosina 198.355; β-galactosidade 131.098; albumina de soro bovino 82.699; anidrase carbônica 40.435; inibidor de tripsina 31.341; lisozima 17.180;

aprotinina 6.913).

3.8.3. Coloração das proteínas por impregnação com prata

A coloração das proteínas por impregnação com prata foi realizada de acordo com a metodologia descrita no kit *PlusOne Silver Staining Protein* (GE Healthcare). A fixação das proteínas foi realizada através da incubação do gel em uma solução fixadora (etanol 30% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v), água deionizada q.s.p) durante 12-16 horas. Em seguida, o gel foi tratado durante 120 minutos sob agitação constante com solução sensibilizante (etanol 30% (v/v), tiosulfato de sódio 5% (p/v), acetato de sódio 21% (p/v) e água deionizada q.s.p) contendo glutaraldeído 25% (p/v) para tornar as proteínas mais reativas ao nitrato de prata. A lavagem foi realizada 5 vezes durante 15 minutos com água deionizada. A impregnação das proteínas com prata foi realizada pela adição de uma solução contendo nitrato de prata 2,5% (p/v) e água deionizada q.s.p, seguido de agitação constante durante 120 minutos. A lavagem foi realizada duas vezes por 1 minuto com água deionizada para remover o excesso de prata da superfície do gel. Em seguida, foi adicionada a solução de desenvolvimento (carbonato de sódio 6% (p/v), água deionizada q.s.p) contendo formaldeído 37% (p/v), seguido de agitação até a visualização dos *spots*. Nesta etapa, o carbonato de sódio torna o meio alcalino (\uparrow pH) e permite que o formaldeído realize a redução do íon prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0). Finalmente, a reação é interrompida pela adição de uma solução contendo EDTA - $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v) e água deionizada q.s.p.

3.8.4. Identificação das proteínas imunogências por *Western Blot*

A identificação das OMPs e OMVs de *A. baumannii* submetidas à eletroforese bi-dimensional foi realizada por *Western Blot*, segundo o protocolo descrito anteriormente no item 3.5.4, inserindo algumas modificações. A transferência das proteínas para a membrana foi realizada durante 90 minutos a 90V. As membranas contendo as OMPs foram incubadas com dois conjuntos contendo cada um 15 soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp. na diluição 1: 200 (v/v) em solução TBS (Tris-HCl 25mM pH 8,0; NaCl 0,15mM) contendo leite em pó desnatado 10% e albumina bovina 1%. Os 30 soros de pacientes infectados que reagiram mais intensamente com as principais OMPs no *western blot* realizado anteriormente no item 3.6.3, foram selecionados para formar o conjunto de soros. As OMVs foram incubadas com um conjunto de 15 soros de pacientes infectados ou colonizados com *Acinetobacter* spp. na mesma diluição citada acima. As OMPs também

foram submetidas à incubação com a mistura contendo os soros de camundongos infectados com *A. baumannii* (n=10) na mesma diluição citada acima (Kurupati et al., 2006). Os conjugados usados foram anti-humano IgG marcado com fosfatase alcalina (Sigma – Aldrich®, USA) e anti-*mouse* IgG marcado com fosfatase alcalina (Sigma – Aldrich®, USA) , respectivamente, ambos na diluição 1:15.000 (v/v) em solução de TBS contendo BSA 1%. O reagente de cor utilizado foi o *Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* (Promega, USA).

4 – RESULTADOS

Os resultados apresentados abaixo correspondem à cinética de crescimento, expressão e identificação das proteínas imunogênicas presentes na membrana externa de *Acinetobacter baumannii*.

4.1. Cinética de crescimento de *Acinetobacter baumannii*

A análise da cinética de crescimento de *Acinetobacter baumannii* foi feita através da medida da absorvância a 600nm em função do tempo de crescimento bacteriano. Por este experimento verificou-se que as cinco cepas estudadas (539LGB, 549LGB, 305LGB, 356LGB e ATCC19606) apresentaram perfis de crescimento semelhantes (figuras 4.1 e 4.2), com quantificação bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL equivalente a densidade ótica 0,8.

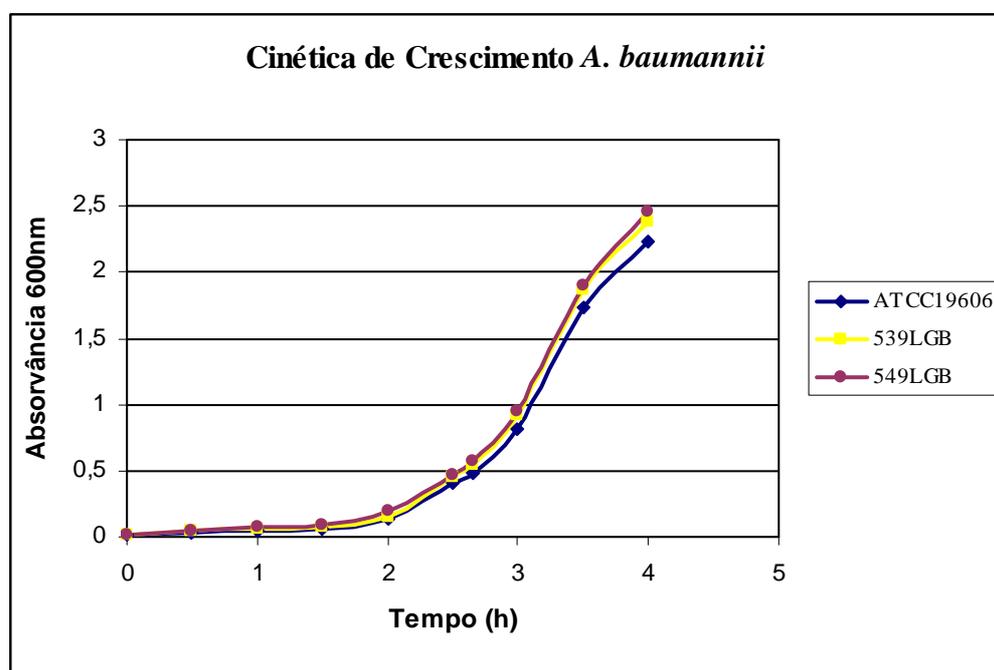


Figura 4.1: Gráfico comparando a cinética de crescimento das diferentes cepas de *A. baumannii*, através da medida da absorvância a 600nm em função do tempo de crescimento. Linha azul – cepa padrão ATCC19606; linha amarela – cepa 539LGB; linha roxa – cepa 549LGB.

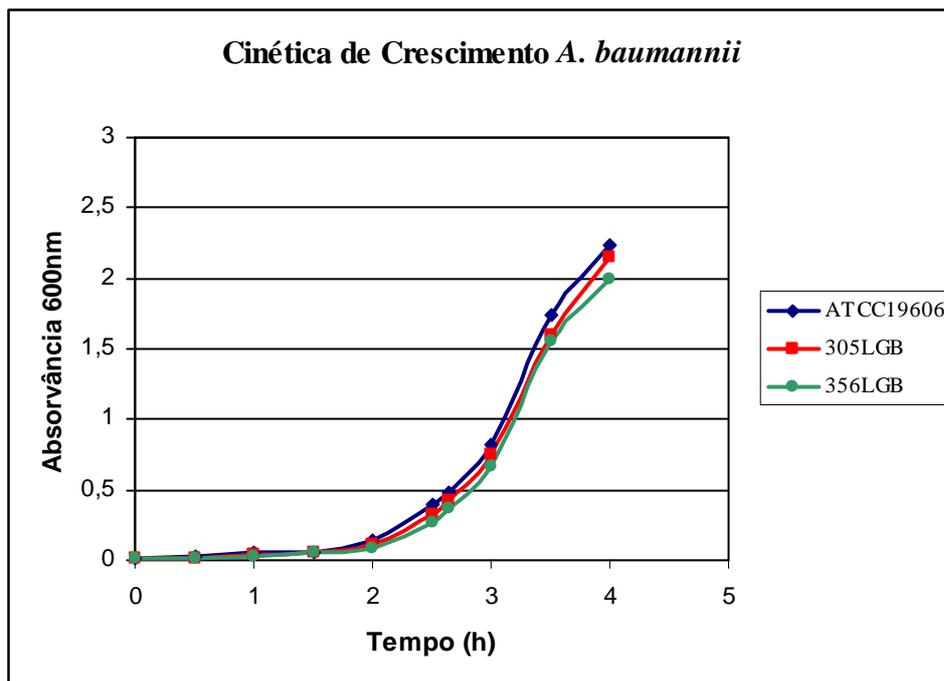


Figura 4.2: Gráfico comparando a cinética de crescimento das diferentes cepas de *A. baumannii*, através da medida da absorvância a 600nm em função do tempo de crescimento. Linha azul – cepa padrão ATCC19606; linha vermelha – cepa 305LGB; linha verde – cepa 356LGB.

4.2. Expressão das proteínas de *A. baumannii*

As proteínas de *A. baumannii* expressas nas fases estacionária e exponencial (DO=0,8) foram analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%. As proteínas foram previamente quantificadas e cerca de 15µg foi utilizado na análise. Na fase exponencial, as cinco cepas de *A. baumannii* apresentaram perfis semelhantes quanto às proteínas expressas e verificou-se a presença em todas as cepas de duas bandas eletroforéticas mais intensas com peso molecular de aproximadamente 40.000 e 41.000 (figura 4.3, ver setas e figura 4.4). Na fase estacionária, foi observada a presença em todas as cepas de uma banda de maior intensidade com PM de aproximadamente 41.000 e verificou-se que algumas proteínas presentes na fase exponencial estavam expressas em menor intensidade ou ausentes na fase estacionária (figura 4.5, ver seta e figura 4.6). Portanto, a cepa padrão ATCC19606 de *A. baumannii* na fase exponencial (DO=0,8) foi selecionada para continuarmos os experimentos, já que os perfis das proteínas expressas nas diferentes cepas (539LGB, 549LGB, 305LGB, 356LGB) estudadas nesta fase de crescimento foram muito parecidos em termos de número e intensidade das bandas eletroforéticas.

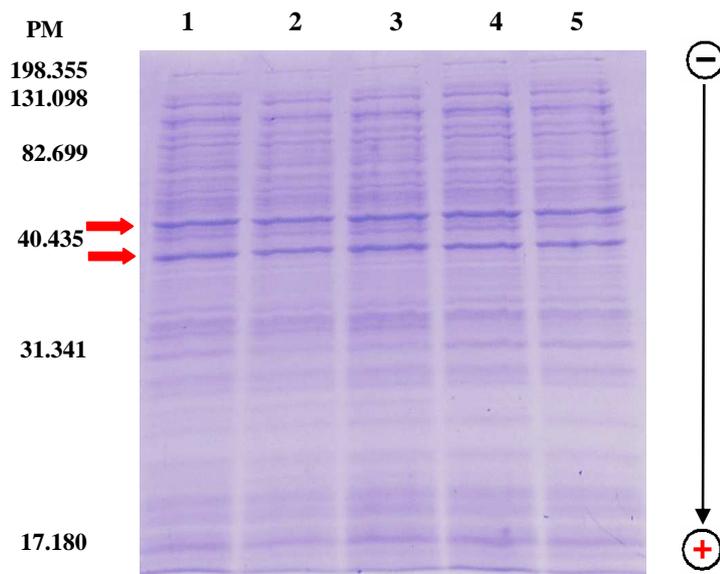


Figura 4.3: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das proteínas de *A. baumannii* na fase exponencial. Raia 1- Cepa 305LGB; Raia 2 - Cepa 356LGB; Raia 3 - Cepa 539LGB; Raia 4 - Cepa 549LGB; Raia 5 - Cepa ATCC19606. Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa 17.180 a 198.355).

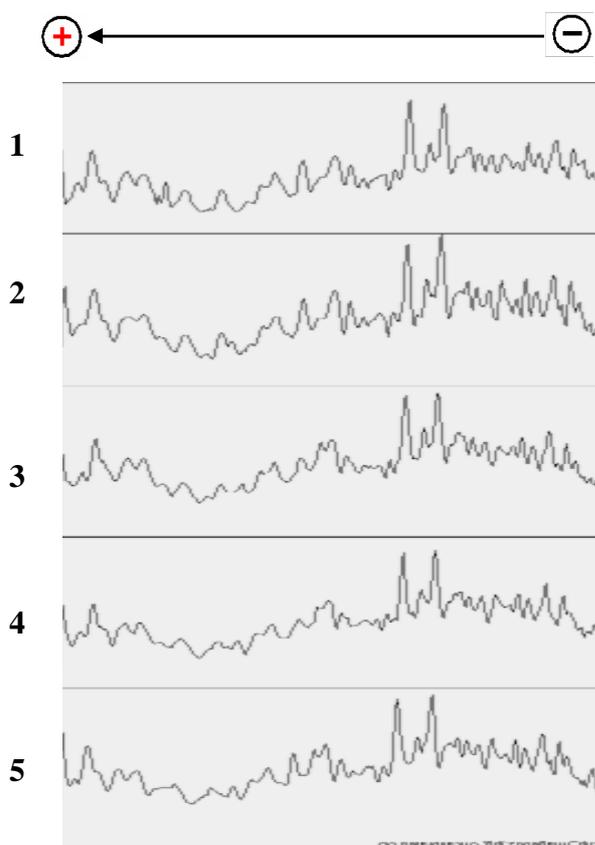


Figura 4.4: Análise densitométrica das bandas protéicas em gel de poliacrilamida 12% das cepas de *A. baumannii* na fase exponencial. Linha 1 - 305LGB; Linha 2 - Cepa 356LGB; Linha 3 - Cepa 539LGB; Linha 4 - Cepa 549LGB; Linha 5 - Cepa ATCC19606.

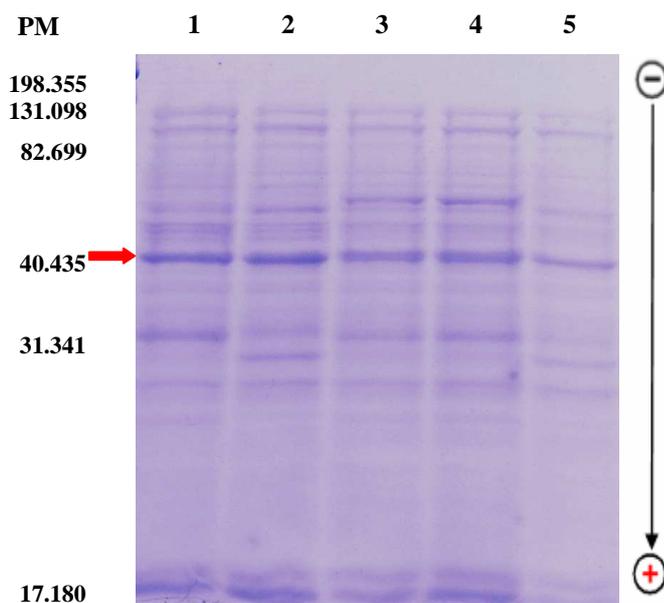


Figura 4.5: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das proteínas de *A. baumannii* na fase estacionária. Raia 1 - Cepa 305LGB; Raia 2 - Cepa 356LGB; Raia 3 - Cepa 539LGB; Raia 4 - Cepa 549LGB; Raia 5 - Cepa ATCC19606. Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa 17.180 a 198.355).

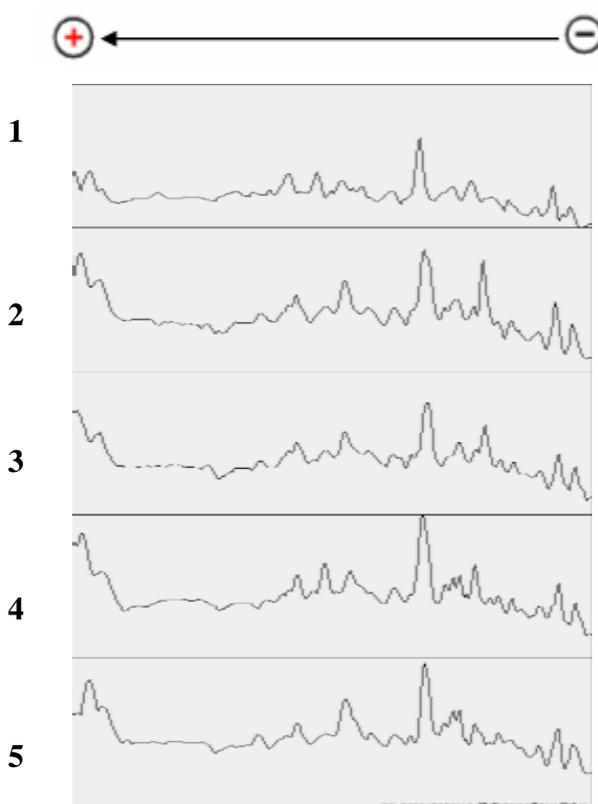


Figura 4.6: Análise densitométrica das bandas protéicas em gel de poliacrilamida 12% das cepas de *A. baumannii* na fase estacionária. Linha 1 - 305LGB; Linha 2 - Cepa 356LGB; Linha 3 - Cepa 539LGB; Linha 4 - Cepa 549LGB; Linha 5 - Cepa ATCC19606.

4.3. Extração das proteínas e vesículas de membrana externa de *A.baumannii*

As proteínas de membrana externa (OMPs) de *A.baumannii* e as vesículas de membrana externa (OMVs) secretadas por este patógeno foram extraídas e analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (figura 4.7). A estimativa dos pesos moleculares das bandas eletroforéticas foi feita em relação a uma curva de calibração realizada com padrões de proteínas de PM conhecidos (figura 4.8), através do programa computacional *Image Master*. Foram observadas oito bandas eletroforéticas principais, isto é, com maior intensidade de cor referente às OMPs (figura 4.7, raia 2; ver setas e tabela 4.1) e cinco bandas de fraca intensidade nas OMVs (figura 4.7, raia 3, ver setas e tabela 4.1).

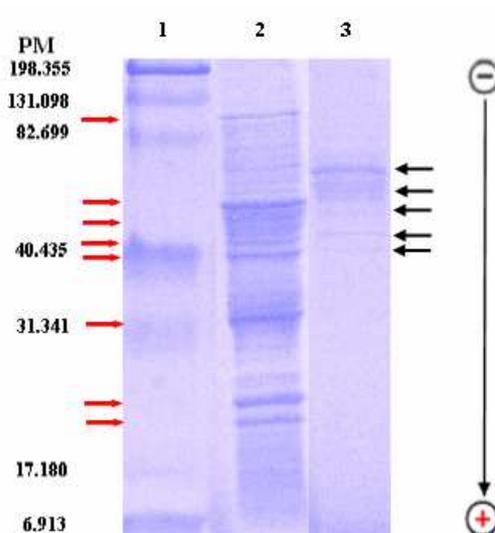


Figura: 4.7: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das OMPs e OMVs extraídas de *A. baumannii* (cepa ATCC19606). Raia 1- Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa 6.913 a 198.355); raia 2 – OMPs; raia 3 – OMVs. Principais OMPs detectadas no gel (setas de cor vermelha) e principais OMVs detectadas no gel (setas de cor preta).

Tabela 4.1: Estimativa dos pesos moleculares das OMPs e OMVs extraídas de *A.baumannii* em relação a uma curva de calibração realizada com padrões de proteínas de PM conhecidos (figura 4.8).

OMPs PM	OMVs PM
84.117	67.013
51.046	56.312
46.127	49.802
42.021	42.432
40.467	40.567
31,031	
23.041	
21.041	

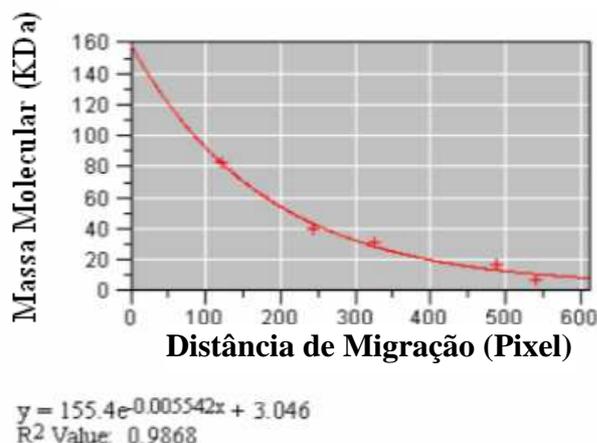


Figura 4.8: Curva de calibração para determinação dos pesos moleculares a partir do SDS-PAGE de padrões de proteínas de PM conhecidos (faixa 6.913 a 198.355).

4.4. Identificação das proteínas imunogênicas em *A. baumannii* (Modelo murino)

4.4.1. Anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de camundongos infectados

O ensaio imuno-enzimático indireto mostrou que o título de anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de camundongos infectados manteve-se 3x superior ao do soro não infectado (controle negativo) até a titulação de aproximadamente 1:3200 (v/v). Além disso, na diluição 1:200 (v/v) os camundongos apresentaram título de anticorpos 7x superior ao do soro não infectado e nas diluições 1:6400 (v/v) a 1:25600 (v/v), o título de anticorpos no soro infectado não atingiu o *cut off* (figura 4.9).

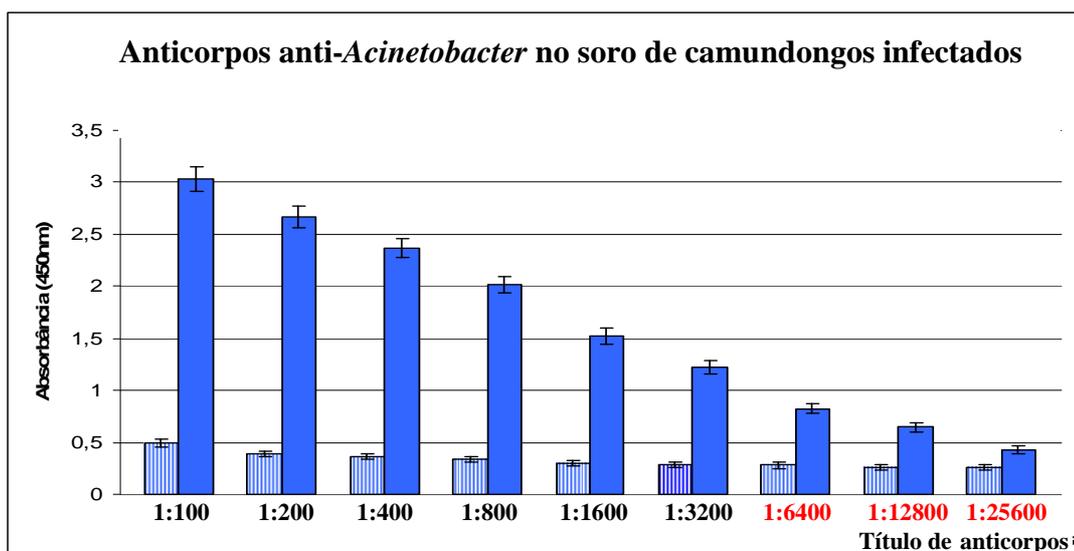


Figura 4.9: Título de anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de camundongos infectados. Soro de camundongo não infectado (branco e azul) na titulação de 1:100 a 1:25600 (v/v) e soro de camundongo infectado por *A. baumannii* (azul) na titulação de 1:100 a 1:25600 (v/v). *Cut off* referente ao título de anticorpos no soro de camundongos infectados foi de 1:3200.

4.4.2. Atividade neutralizante do soro de camundongos infectados por *A. baumannii*

Este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar a atividade neutralizante dos anticorpos presentes no soro de camundongos infectados contra *A. baumannii*. Estes resultados sugerem que os anticorpos presentes nos soros dos camundongos infectados, foram capazes de reduzir a concentração bacteriana (UFC/mL) de 66,89% (t =1h), 74,30% (t=2h) e 30,82% (t =3h). Estes dados foram obtidos ao comparar os valores da concentração de bactérias após a incubação com o soro de camundongos infectados com os valores obtidos a partir da incubação deste patógeno com o soro não infectado (tabela 4.2).

Tabela 4.2: Variação da concentração bacteriana (UFC/mL) em função do tempo na presença do soro de camundongo não infectado (coluna 2) e do soro policlonal de camundongo infectado por *A. baumannii* (coluna 3).

Tempo (h)	Concentração bacteriana (UFC/mL) – Controle*	Concentração bacteriana (UFC/mL) – Infectado*	Redução da concentração bacteriana
0	2,884x10 ⁵	2,884x10 ⁵	Zero
1	1,862x10 ⁶	6,165x10 ⁵	66,89%
2	2,454x10 ⁶	6,309x10 ⁵	74,30%
3	1,00 x10 ⁹	6,918x10 ⁸	30,82%

* Média da concentração bacteriana (UFC/mL).

4.4.3. Caracterização Imunoquímica por *Western Blot*

Após a extração das proteínas de membrana externa (OMPs) e das vesículas de membrana externa (OMVs) de *A. baumannii*, realizou-se a identificação de proteínas imunogênicas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12%, seguida de eletrotransferência e imunorevelação (*Western Blot*). As OMPs e OMVs detectadas no SDS-PAGE 12% foram comparadas com as proteínas reveladas através da reação com soro de camundongos infectados pela cepa ATCC19606 de *A. baumannii*, respectivamente (tabela 4.3). Por este experimento, foram detectadas sete bandas referentes às OMPs reveladas através da reação com a mistura contendo os soros de camundongos infectados pela referida bactéria, sendo que quatro delas foram reveladas em maior intensidade, com PM de aproximadamente 23.000, 31.000, 40.000 e 52.000 (figura 4.10, raia 3, ver setas). Na análise das proteínas associadas às OMVs, uma banda eletroforética com PM de aproximadamente 42.000 foi considerada a principal, pois foi revelada em maior intensidade com os soros de

camundongos infectados (figura 4.10, raia 5, ver seta). Além disso, foi constatado que nenhuma banda eletroforética foi detectada ao realizar a incubação das OMPs e OMVs com soro de camundongo não infectado (controle negativo) por *A. baumannii* (figura 4.10, raias 2 e 4).

A estimativa dos pesos moleculares das proteínas reveladas foi feita em relação a uma curva de calibração realizada com padrões de proteínas coradas de pesos moleculares conhecidos (miosina 198.355; β -galactosidade 131.098; albumina de soro bovino 82.699; anidrase carbônica 40.435; inibidor de tripsina 31.341; lisozima 17.180; aprotinina 6.913), através do uso do programa computacional *Image Master* (figura 4.11). Os valores de PM em evidência na cor cinza na tabela 4.3 se referem às principais OMPs e OMVs reveladas através da reação com soro de camundongo infectado pela cepa ATCC19606 de *A. baumannii*.

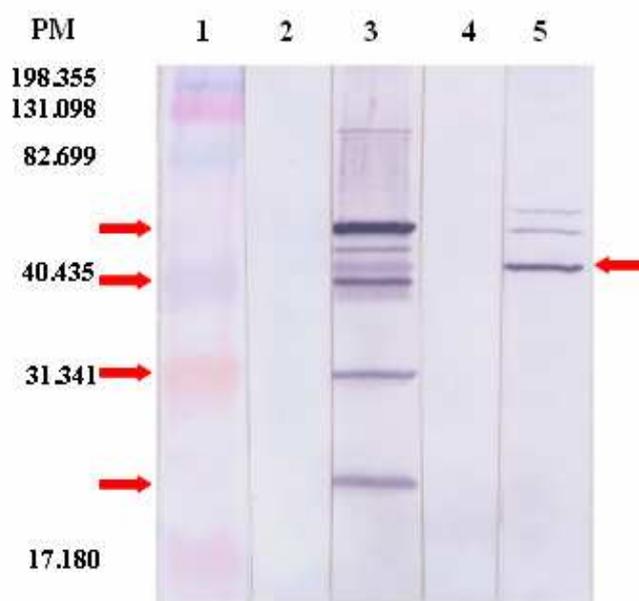


Figura 4.10: *Western blot* mostrando as OMPs e OMVs detectadas em *A. baumannii* através da reação com os soros de camundongos infectados. Raia 1 – Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355); raia 2 – OMPs incubadas com soro de camundongo não infectado por *A. baumannii*; raia 3 - OMPs incubadas com soros de camundongos infectados por *A. baumannii*; raia 4 - OMVs incubadas com soro de camundongo não infectado por *A. baumannii*; raia 5 - OMVs incubadas com soros de camundongos infectados por *A. baumannii*. OMPs reveladas em maior intensidade com soros de camundongos infectados (raia 3, ver setas). Banda referente a proteína associada às OMVs revelada em maior intensidade com soros de camundongos infectados (raia 5, ver seta).

Tabela 4.3: Estimativa dos pesos moleculares, comparando as principais OMPs e OMVs detectadas no SDS-PAGE 12% que foram reveladas através da reação com o soro de camundongo infectado por *A. baumannii*, respectivamente.

OMPs detectadas no SDS-PAGE	OMPs reveladas por Western blot	OMVs detectadas no SDS-PAGE	OMVs reveladas por Western blot
51.046	51.932	67.013	
46.127	45.751	56.312	56.688
42.021	41.885	49.802	50.440
40.467	39.902	42.432	42.020
37.658	37.860	40.567	
31,031	31.508		
23.041	23.023		

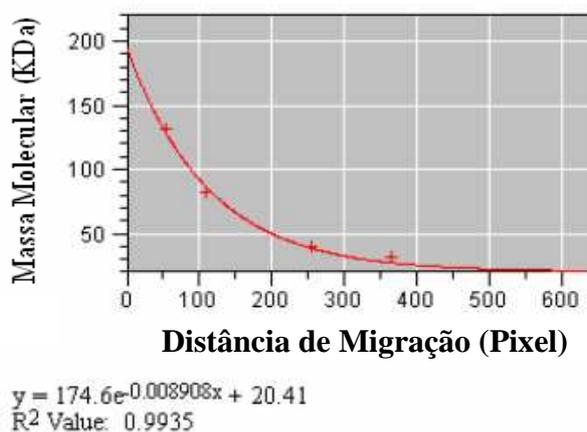


Figura 4.11: Curva de calibração para determinação dos pesos moleculares a partir da eletroforese de padrões de proteínas de PM conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355) em gel de poliacrilamida 12%, seguido de imunorevelação após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (*Western blot*).

4.5. Identificação das proteínas imunogênicas em *A. baumannii* (Soro Humano)

4.5.1. Soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp.

No período de outubro de 2009 a dezembro de 2010, foram obtidos 50 soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp., originados de centros de saúde, conforme mostra a tabela 4.4. Os soros foram coletados de pacientes, cujas amostras clínicas analisadas (aspirado traqueal, líquido, sangue, cateter, líquido peritoneal, urina e outros) apresentaram resultado positivo para *Acinetobacter* spp. Foram obtidos 2 soros de recém-nascidos não infectados por este patógeno (n=2), que participaram do estudo como controle negativo.

Tabela 4.4: Origem dos soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp.

HOSPITAIS	LOCALIZAÇÃO	PACIENTES (n=50)
Samaritano e Amparo (Laboratório Richet)	Rio de Janeiro (RJ)	7
Hospital de Pronto Socorro (HPS)	Porto Alegre (RS)	13
Instituto Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ)	Rio de Janeiro (RJ)	4
Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)	Rio de Janeiro (RJ)	22
Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP)	Niterói (RJ)	4

4.5.2. Caracterização Imunoquímica por *Western Blot*

As proteínas de membrana externa (OMPs) e as proteínas associadas às OMVs extraídas de *A. baumannii* foram identificadas por *Western Blot*, através da reação com 50 soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp., respectivamente. Os pesos moleculares das OMPs e OMVs de *A. baumannii* identificadas foram estimados através do uso do programa computacional *Image Master* e a porcentagem na qual estas proteínas foram encontradas nos soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. foi analisada considerando uma faixa de peso molecular com erro de até 5% (tabelas 4.5 e 4.6). As OMPs identificadas através da reação com os soros de camundongos infectados (tabela 4.3, coluna 2) foram comparadas com aquelas reveladas através da reação com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. (figura 4.13). Estes resultados sugerem que as bandas eletroforéticas mais fortes, referentes às OMPs encontradas no soro de camundongo infectado, com PMs de aproximadamente 23.000, 31.000, 40.000 e 52.000, foram identificadas em 42%, 42%, 88% e 36% dos pacientes infectados, respectivamente (figura 4.13). Estas proteínas estão evidenciadas na figura 4.12 (ver setas), a qual ilustra a reação das OMPs, por exemplo, com dois soros de pacientes infectados. As proteínas detectadas em uma porcentagem maior que 40% nos soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. estão listadas na tabela 4.5. Também foram observadas bandas eletroforéticas de intensidade fraca que reagiram com soro de recém nascido não infectado por *Acinetobacter* spp. (controle negativo) com PMs de aproximadamente 96.000, 76.000 e 61.000.

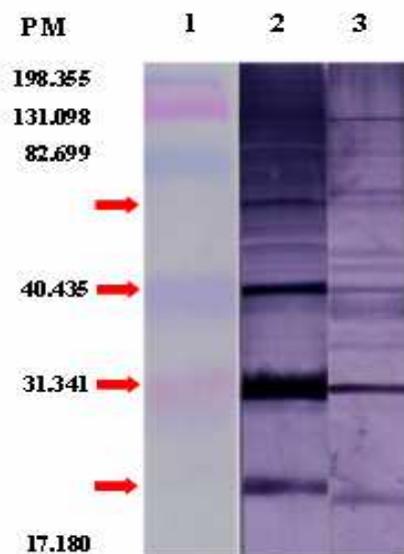


Figura 4.12: *Western blot* representativo das proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. baumannii* reveladas com os soros de pacientes infectados. Raia 1– Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355); raias 2 e 3 - OMPs incubada com soro de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp.

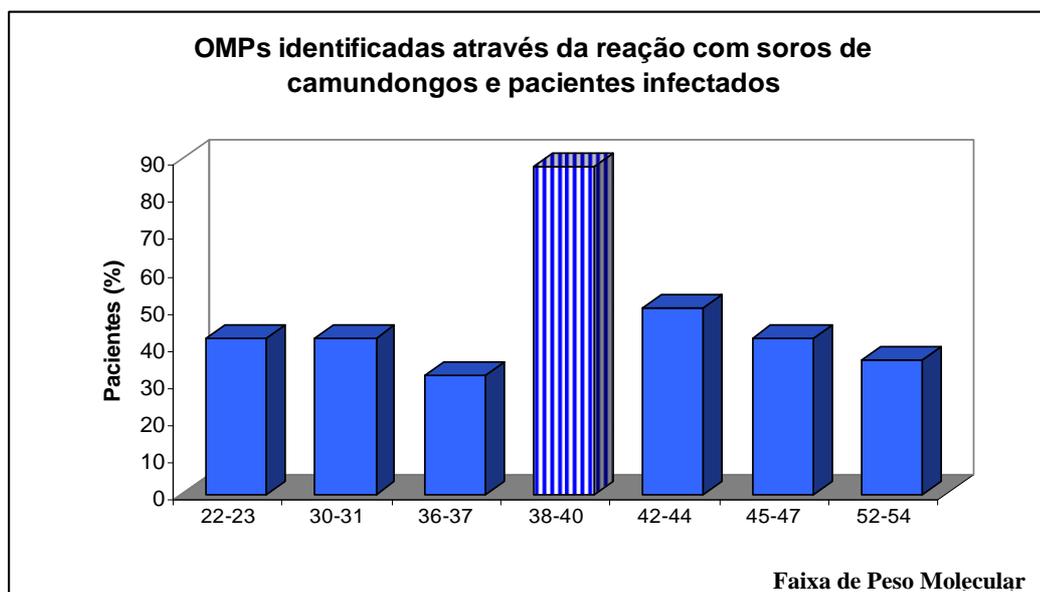


Figura 4.13: Gráfico representativo comparando as OMPs identificadas no soro de camundongos infectados que provavelmente foram reveladas com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. OMP de PM entre 38-40 foi identificada em 88% dos pacientes (coluna na cor azul e branca).

Tabela 4.5: Porcentagem das OMPs identificadas em pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp., considerando uma faixa de peso molecular com erro de até 5%.

Peso Molecular	Pacientes (%)
38.000-40.000	88
26.000-27.000	64
62.000-64.000	62
32.000-33.000	54
71.000-73.000	52
42.000-44.000	50
28.000-29.000	48
30.000-31.000	42
45.000-47.000	42
22.000-23.000	42

As proteínas associadas às OMVs identificadas através da reação com soro de camundongos infectados por *A. baumannii* foram comparadas com aquelas reveladas através da reação com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. (figura 4.15). Estes resultados sugerem que a proteína associada às OMVs detectada em maior intensidade no soro de camundongos infectados, com PM de aproximadamente 42.000, foi identificada em 26% dos pacientes infectados (figura 4.15). Além disso, foi observado que outras proteínas que não reagiram com o soro de camundongos infectados, foram encontradas nos soros de pacientes infectados, com realce para as proteínas com PM entre 71.000-72.000 e 67.000-68.000 que foram identificadas em 40% e 38% dos soros de pacientes infectados (n=50), respectivamente (tabela 4.6). Estas proteínas estão indicadas por setas na figura 4.14, a qual ilustra a reação das OMVs, por exemplo, com três soros de pacientes infectados. As principais proteínas associadas às OMVs encontradas nos soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. estão listadas na tabela 4.6. Também foi observada a presença de algumas bandas eletroforéticas ao realizar a incubação das proteínas associadas às OMVs com soro de recém nascido não infectado por *Acinetobacter* spp., com PM de aproximadamente 94.000 e 32.000, apresentando bandas de intensidade fraca.

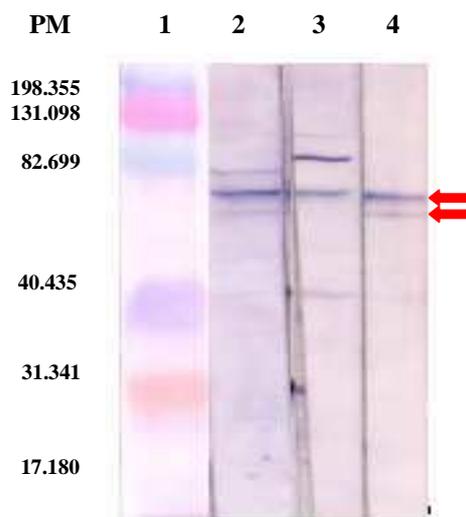


Figura 4.14: *Western blot* representativo das OMVs *A. baumannii* reveladas com os soros de pacientes infectados. Raia 1 – Padrão de proteínas de PMs conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355); raias 2 a 4 -OMVs incubadas com soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. As proteínas de PM entre 71.000-72.000 e 67.000-68.000 que foram identificadas em 40% e 38% dos pacientes, respectivamente (ver setas de cor vermelha).

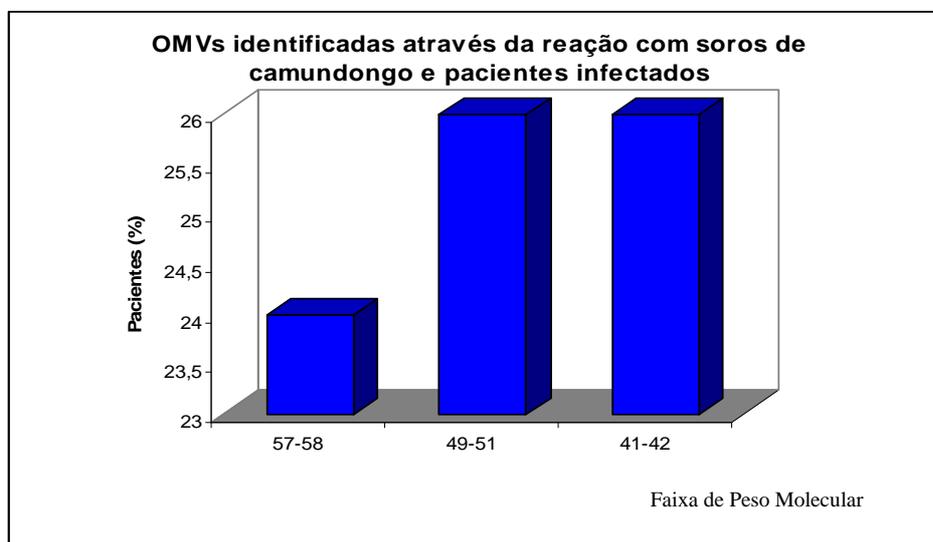


Figura 4.15: Gráfico representativo comparando as OMVs detectadas no soro de camundongos infectados que provavelmente foram reveladas com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp.

Tabela 4.6: Porcentagem das OMVs identificadas em pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp., considerando uma faixa de peso molecular com erro de até 5%.

Peso Molecular	Pacientes (%)
71.000-72.000	40
67.000-68.000	38
52.000-54.000	26
49.000-51.000	26
41.000-42.000	26
57.000-58.000	24
80.000-82.000	24

4.5.3. Anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de pacientes infectados

O ensaio imuno-enzimático indireto mostrou que o título de anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de pacientes infectados apresentou uma variabilidade quanto ao *cut off* estabelecido neste ensaio, que foi o valor da densidade ótica do soro infectado 3x superior a DO do soro não infectado (controle negativo). Os soros dos pacientes infectados que apresentaram reação mais intensa com as proteínas de membrana externa no *Western blot* (n=31) realizado com um total de 50 soros, foram selecionados para este ensaio (figura 4.16).

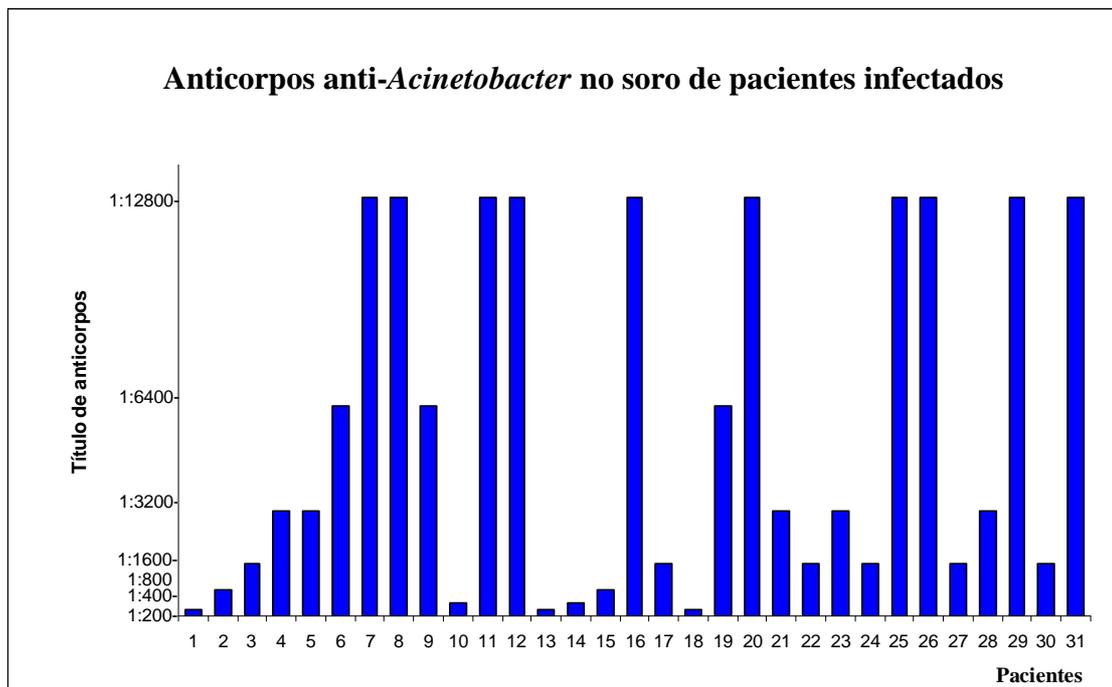


Figura 4.16: Título de anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de pacientes infectados. Soros de paciente infectado por *Acinetobacter* spp. (azul) na titulação de 1:200 a 1:12800 (v/v). Eixo y corresponde ao *Cut off* referente ao título de anticorpos no soro de cada paciente infectado.

4.6. Análise das OMPs de *Escherichia coli* e *A.baumannii*

A comparação entre as proteínas de membrana externa de *E. coli* e *A. baumannii* foi realizada por SDS-PAGE 12% (figura 4.17). Por este experimento, observou-se a presença de duas bandas eletroforéticas principais, isto é, com maior intensidade de cor referente às OMPs de *E. coli* com PM de aproximadamente 35.000 e 37.000 e quatro bandas principais com PM de aproximadamente 51.000, 40.000, 31.000 e 26.000 em *A.baumannii* (figura 4.17, ver setas). De uma forma geral, não foram observadas bandas com o mesmo PM entre as OMPs das duas bactérias analisadas, demonstrando que os perfis das proteínas expressas no gel são diferentes.

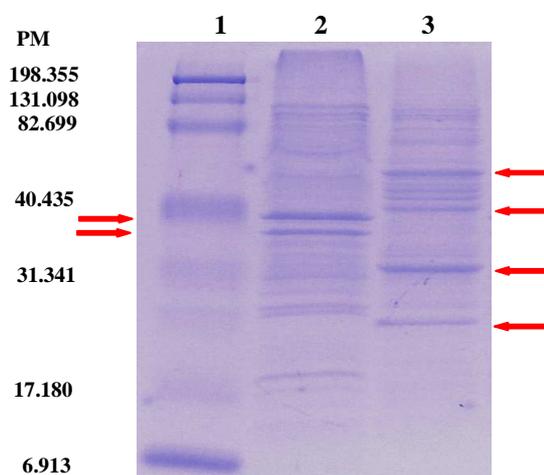


Figura: 4.17: SDS-PAGE 12% das OMPs extraídas de *A. baumannii* e *E. coli*. Raia 1- Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 6.913 a 198.355); raia 2 – OMPs de *E. coli*; raia 3 – OMPs de *A. baumannii*.

4.7. Caracterização das proteínas de *A.baumannii* por eletroforese bi-dimensional (2D)

A fim de obter uma melhor caracterização das OMPs e OMVs de *A. baumannii*, tais proteínas foram analisadas por eletroforese bi-dimensional (2D), com valores de ponto isoelétrico (pI) entre 3-10, segundo o fabricante do produto. Por este experimento foi observado que a maioria das OMPs e OMVs de *A. baumannii* são proteínas ácidas que foram detectadas em uma faixa de PM entre 82.000 e 18.000 e $pI < 7,0$ (figuras 4.18 e 4.19).

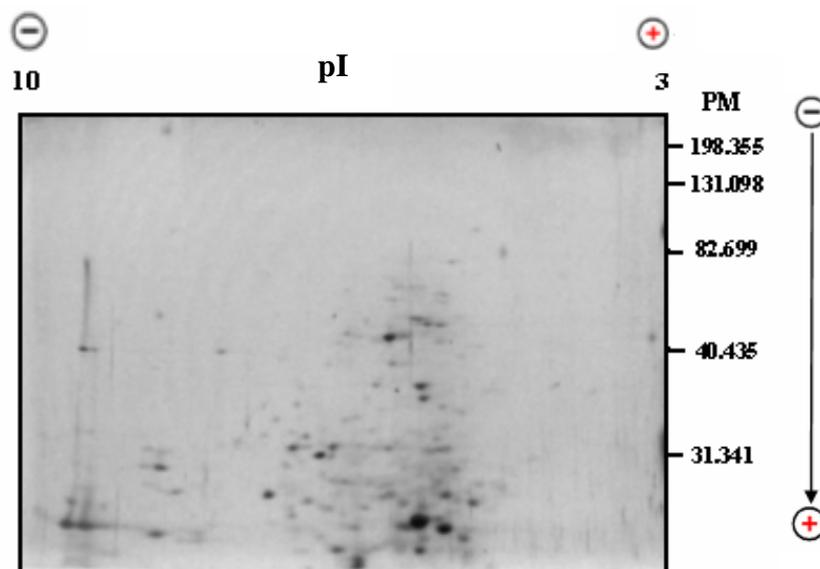


Figura 4.18: OMPs da cepa ATCC19606 de *A. baumannii* separadas por eletroforese bi-dimensional na faixa de pI 3-10. Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355). As proteínas foram reveladas pelo método de coloração por nitrato de prata.

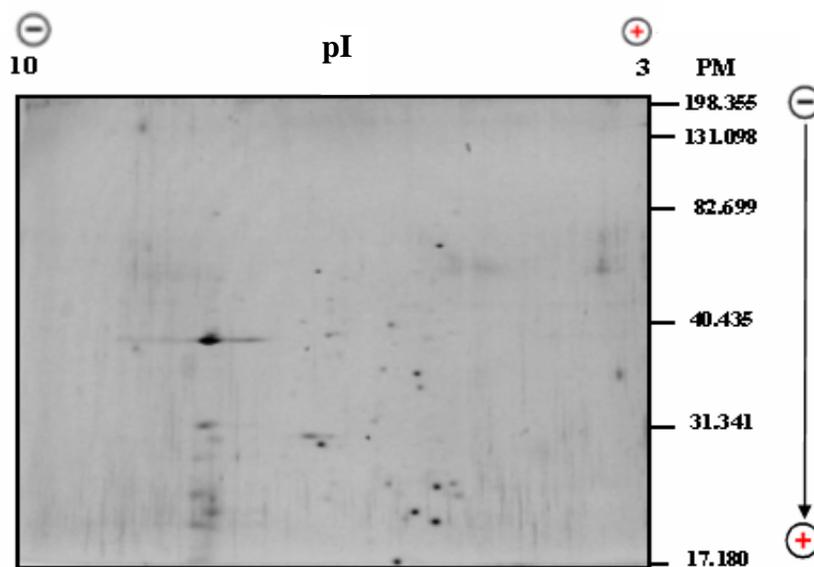


Figura 4.19: OMVs da cepa ATCC19606 de *A. baumannii* separadas por eletroforese bi-dimensional na faixa de pI 3-10. Padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355). As proteínas foram reveladas pelo método de coloração por nitrato de prata.

4.8. Identificação das proteínas imunogênicas de *A.baumannii* por *Western Blot*

4.8.1. Reatividade das OMPs de *A. baumannii* com soros de camundongos infectados

As principais proteínas imunogênicas (OMPs) que apresentaram reatividade com o soros de camundongos infectados por *A.baumannii* (figura 4.10, raia 3, ver setas), foram melhor caracterizadas por eletroforese bi-dimensional e identificadas por *Western Blot*. Estes resultados foram comparados com a análise proteômica das OMPs realizada por Soares et al. (2009), conforme mostra a tabela 4.7. Em nosso trabalho, foi observada a presença de duas proteínas que foram reveladas com maior intensidade: uma com PM na faixa de 38.000-40.000 e pI estimado em aproximadamente 5,4 (figura 4.20, *spot* 3), que provavelmente seria um precursor de Omp 38 (Omp A) e a outra com PM na faixa de 52.000-54.000 e pI estimado em aproximadamente 5,4 (figura 4.20, *spot* 1). Além disso, uma proteína com PM na faixa de 82.000-84.000 e com pI estimado em aproximadamente 5,4 (figura 4.20, *spot* 6) foi observada em nosso estudo, mas não descrita na análise proteômica realizada por Soares et al. (2009).

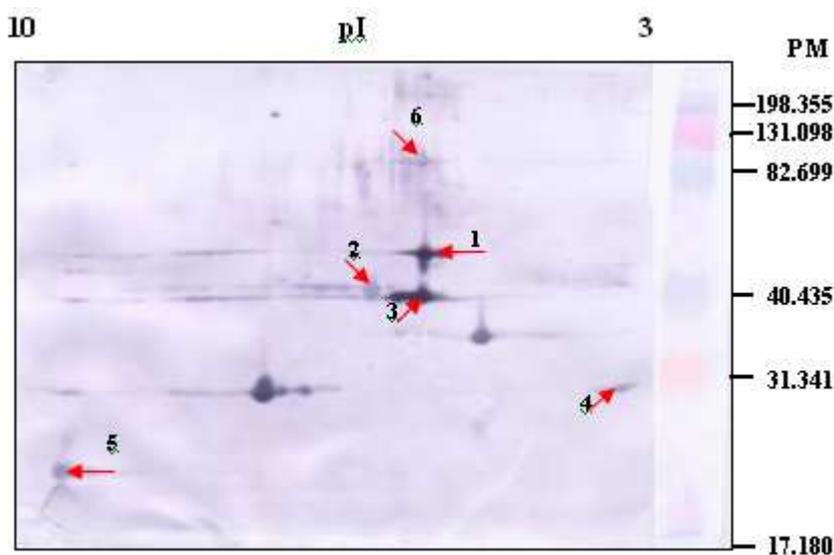


Figura 4.20: *Western blot* das OMPs de *A. baumannii* que apresentaram reatividade com a mistura contendo soros de camundongos infectados por *A. baumannii* (n=10). Padrão de proteínas coradas de pesos moleculares conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355). OMPs identificadas através da reação com o soro de camundongo infectado na figura 4.10, que foram melhor caracterizadas por eletroforese bi-dimensional, seguida de *Western blot* (setas em vermelho).

Tabela 4.7: As principais proteínas imunogênicas (OMPs) identificadas através da reação com o soro de camundongos infectados por *A.baumannii*.

Spot	P M	pI	Proteína *
1	52.000-54.000	5,4	Proteína transportadora de ácidos graxos de cadeia longa
2	42.000-44.000	5,8	Provavel porina sensível a glicose (OprB)
3	38.000-40.000	5,4	Precursor Omp 38 (Omp A)
4	30.000-31.000	3,2	Omp 33-36 KDa
5	22.000-23.000	8,7	Desidrogenase NADH
6	82.000-84.000	5,4	Não caracterizada

*Identificação das OMPs de acordo com a análise proteômica de *A. baumannii* realizada por Soares et al. (2009). Os dados do atual estudo (PM e pI) precisam ser confirmados posteriormente por MALDI-TOF.

4.8.2. Reatividade das OMPs de *A. baumannii* com soros de pacientes infectados

As principais proteínas imunogênicas (OMPs) encontradas através da reação com os 50 soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. (figura 4.12, ver setas) foram melhor caracterizadas por eletroforese bi-dimensional, identificadas por *Western Blot* e em seguida, comparadas com as proteínas imunogênicas que apresentaram reatividade com os soros de camundongos infectados por *A.baumannii* (tabela 4.7) Estes resultados foram analisados de acordo com a análise proteômica das OMPs realizada por Soares et al. (2009), conforme mostra a tabela 4.8. Em nosso trabalho, as OMPs foram incubadas com dois conjuntos de soros diferentes, contendo cada um 15 soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp., os quais foram selecionados para este ensaio porque apresentaram reação mais forte com as principais OMPs no *western blot* realizado anteriormente no item 4.5.2. Por este experimento, foi observado que os dois conjuntos de soros de pacientes infectados reagiram com uma proteína na faixa de PM entre 38.000 a 40.000 e pI estimado em aproximadamente 5,4 (figuras 4.21 e 4.22, ver *spots* 4). Este resultado sugere que tal proteína seja a OMP que apresentou reatividade anteriormente com 88% dos soros de pacientes infectados (n=50) e também com os soros de camundongos infectados (n=10) por *A. baumannii* (figura 4.13). De acordo com Soares et al. (2009), esta proteína de membrana externa identificada em nosso estudo pode ser uma precursora de Omp38 (OmpA), como mostra a tabela 4.8. Além disso, uma proteína com PM na faixa de 82-84.000 e com pI estimado em aproximadamente 5,2 foi

identificada através da reação com os dois conjuntos de soros de pacientes infectados (figura 4.21, *spot 7* e figura 4.22, *spot 7*). As proteínas de membrana externa que apresentaram reatividade com os camundongos e pacientes infectados na figura 4.13 e que provavelmente foram reveladas através da reação com os dois conjuntos de soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. (figuras 4.21 e 4.22), estão listadas na tabela 4.8.

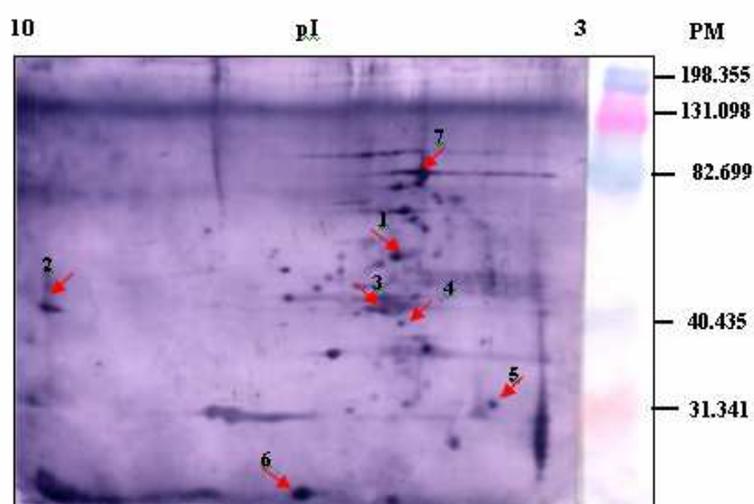


Figura 4.21: *Western blot*, mostrando as OMPs de *A. baumannii* que foram reveladas com o primeiro conjunto de 15 soros de pacientes infectados. Padrão de proteínas coradas de PMs conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355). OMPs identificadas através da reação com os soros de pacientes infectados na figura 4.14, que foram melhor caracterizadas por eletroforese bi-dimensional, seguida de *Western blot* (setas em vermelho).

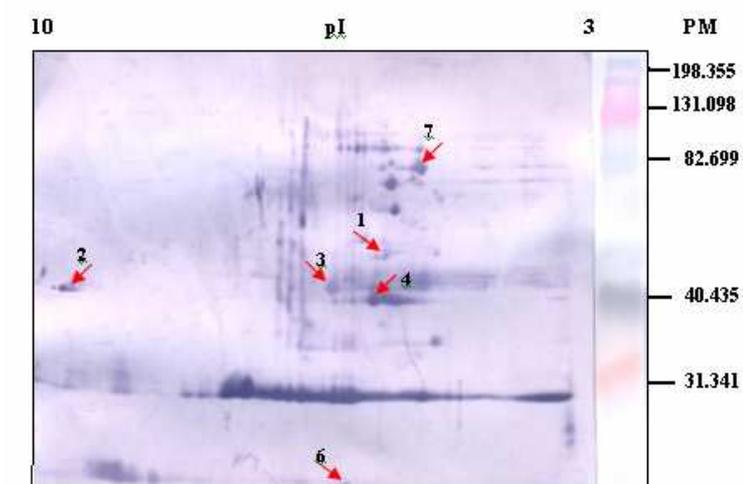


Figura 4.22: *Western blot*, mostrando as OMPs de *A. baumannii* que foram reveladas com o segundo conjunto de 15 soros de pacientes infectados. Padrão de proteínas coradas de PMs conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355). Principais OMPs identificadas através da reação com os soros de pacientes infectados (setas em vermelho). OMPs identificadas através da reação com o soro de pacientes infectado na figura 4.14, que foram melhor caracterizadas por eletroforese bi-dimensional, seguida de *Western blot* (setas em vermelho).

Tabela 4.8: As principais proteínas imunogênicas (OMPs) identificadas através da reação com os dois conjuntos de soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp.

Spot	P M	pI	Pacientes	Proteína *
1	52.000-54.000	5,4	36%	Proteína transportadora de ácidos graxos de cadeia longa
2	42.000-44.000	9,0	50%	Omp OprD
3	42.000-44.000	5,8	50%	Provável porina sensível a glicose (OprB)
4	38.000-40.000	5,4	88%	Precursor Omp 38(Omp A)
5	30.000-31.000	3,5	42%	Omp 33-36 KDa
6	22.000-23.000	6,5	42%	Provável protease
7	82.000-84.000	5,2	36%	Não caracterizada

* Identificação das OMPs de acordo com a análise proteômica de *A. baumannii* realizada por Soares et al. (2009). Os dados do atual estudo (PM e pI) precisam ser confirmados posteriormente por MALDI-TOF.

4.8.3. Reatividade das OMVs de *A. baumannii* com soros de pacientes infectados

As principais proteínas associadas às OMVs que apresentaram reatividade com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. (tabela 4.6) foram melhor caracterizadas por eletroforese bi-dimensional e identificadas por *Western Blot*. Estes resultados foram analisados de acordo com a análise proteômica das OMVs realizada por Kwon et al. (2009), conforme mostra a tabela 4.9. Em nosso trabalho, as proteínas associadas às vesículas de membrana externa (OMVs) de *A. baumannii* foram incubadas com um conjunto de 15 soros de pacientes infectados que reagiram mais intensamente com as OMVs no *Western blot* realizado anteriormente no item 4.5.2. Por este experimento foi identificada uma proteína associada às OMVs que reagiu de forma mais intensa com os soros de pacientes infectados, com PM na faixa de 80.000-82.000 e com valor de pI estimado em aproximadamente 4,5 (figura 4.23, *spot* 1). Segundo Kwon et al. (2009), esta proteína presente nas OMVs que foi identificada em nosso estudo, provavelmente se trata de uma proteína de membrana externa receptora de sideróforo férrico (tabela 4.9). A proteína associada às OMVs que apresentou reação mais forte com o soro de camundongos infectados em nosso trabalho, com PM entre 41-42.000 (figura 4.10, raia 5 ver seta), apresentou na análise da 2D o valor de pI estimado em aproximadamente 5,6 (figura 4.23, *spot* 5), se referindo provavelmente a uma porina sensível a glicose (OprB). As principais proteínas (OMVs) que apresentaram reatividade com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. estão listadas nas tabelas 4.9.

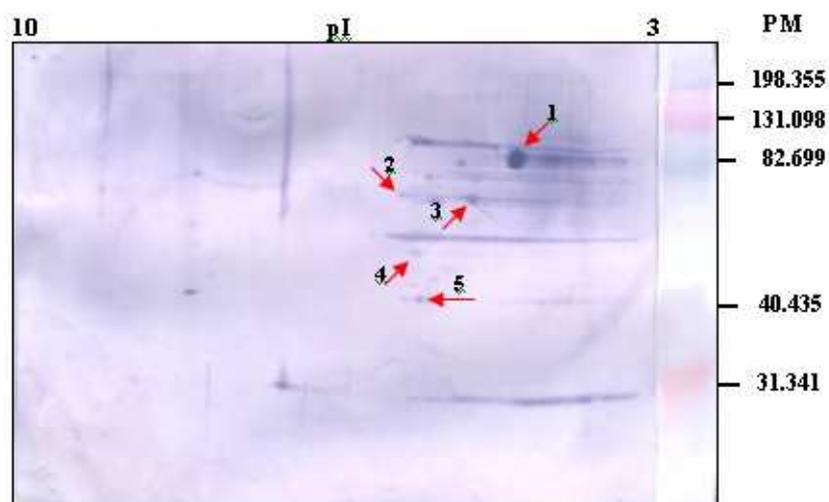


Figura 4.23: *Western blot*, mostrando as OMVs de *A. baumannii* que foram reveladas com um conjunto de 15 soros de pacientes infectados. Padrão de proteínas coradas de PMs conhecidos (faixa de 17.180 a 198.355). Principais OMVs identificadas através da reação com os soros de pacientes infectados (setas em vermelho).

Tabela 4.9: As principais proteínas imunogênicas (OMVs) identificadas através da reação com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp.

<i>Spot</i>	PM	pI	Pacientes	Proteína *
1	80.000-82.000	4,5	24%	Receptor de sideróforo férrico
2	71.000-72.000	6,1	40%	Provável receptor de membrana externa (OprC)
3	67.000-68.000	5,2	38%	Receptor ferro ferricromo
4	50.000-51.000	5,6	26%	Transportadora de ácidos graxos de cadeia longa
5	41.000-42.000	5,6	26%	Porina sensível a glicose (OprB-like)

* Identificação da proteína de acordo com a análise proteômica das OMVs de *A. baumannii* realizada por Kwon et al. (2009). Os dados do atual estudo (PM e pI) precisam ser confirmados posteriormente por MALDI-TOF.

5. DISCUSSÃO

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno oportunista Gram-negativo freqüentemente associado a surtos nosocomiais em todo o mundo (Villegas e Hartstein, 2003). Este patógeno tornou-se particularmente problemático no Brasil devido a sua prevalência e padrões de resistência a vários antimicrobianos (Carvalho et al., 2009).

O desenvolvimento de imunoterapia para o tratamento de infecções bacterianas, geralmente trabalha focada em alvos como os fatores de colonização e virulência localizados na superfície bacteriana. Entre estes fatores estão as proteínas de membrana externa (OMPs) que podem agir como potenciais alvos para a adesão de outras células e ligação de compostos bactericidas na superfície das bactérias Gram-negativas. Além disso, a maioria das bactérias Gram-negativas secretam vesículas de membrana externa (OMVs) durante o crescimento *in vitro* e nas infecções *in vivo*. Os fatores de virulência presentes na superfície das OMVs permitem a aderência às células hospedeiras e a internalização dos componentes vesiculares. Isto indica que as vesículas secretadas de *A. baumannii* atuam como um veículo para o transporte de moléculas efetoras (múltiplas proteínas associadas à virulência) para o interior das células hospedeiras (Kwon et al., 2009).

Desta forma, em virtude das características deste patógeno - em especial da dificuldade de tratamento com antimicrobianos convencionais - o desenvolvimento de novas estratégias de eliminação e controle desta bactéria são de alta relevância. Portanto, neste trabalho foram identificadas proteínas imunogênicas (OMPs e OMVs) de *Acinetobacter baumannii*, como possíveis alvos para o desenvolvimento de alternativas de tratamento baseadas na imunoterapia.

5.1. Expressão das proteínas de *A. baumannii*

A. baumannii foi selecionada para o estudo, pois é a espécie considerada de grande importância clínica, sendo responsável pela maioria dos surtos de infecções hospitalares envolvendo o gênero *Acinetobacter* (Towner, 2009). Na fase exponencial, as cinco cepas de *A. baumannii* estudadas (539LGB, 549LGB, 305LGB, 356LGB e ATCC19606) apresentaram perfis semelhantes quanto à cinética de crescimento e expressão das proteínas *in vitro*. Portanto, a cepa padrão ATCC19606 na fase exponencial (DO=0,7) foi selecionada

para continuarmos os experimentos, já que os perfis das proteínas expressas nas demais cepas estudadas nesta fase de crescimento foram muito parecidos.

As proteínas de membrana externa (OMPs) de *A.baumannii* são capazes de estimular o sistema imune do hospedeiro e, além disso, estas bactérias secretam vesículas de membrana externa (OMVs) que transportam fatores de virulência para o interior da célula hospedeira (Vila et al., 2007; Kwon et al., 2009). Sendo assim, as OMPs e OMVs foram extraídas da superfície e do sobrenadante de cultivo de *A. baumannii*, respectivamente e identificadas através da reação com os soros de camundongos infectados com a referida bactéria e com os soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp. A infecção em modelo murino foi realizada, pois estes animais estão imunocompetentes e além disso, são camundongos livres de germes patogênicos específicos (SPF- *Specific Pathogen Free*) como determinados vírus, bactérias ou parasitas, evitando assim a possibilidade de reação cruzada com outros patógenos. Nos humanos, as infecções causadas por *A. baumannii multiresistente* (MDR) são frequentes em pacientes debilitados (imunocomprometidos), pacientes sujeitos a procedimentos invasivos e em tratamento com antibióticos de amplo espectro (Perez et al., 2007; Towner, 2009). Desta forma, no presente estudo foi realizada a comparação entre as proteínas imunogênicas identificadas através da reação com os soros de camundongos e pacientes infectados.

5.2. Análise dos soros de camundongos e pacientes infectados por *A. baumannii*

O esquema de infecção com doses subletais em camundongos mostrou que tais animais responderam bem à infecção por *A. baumannii* apresentando títulos de anticorpos contra as proteínas de superfície de *A. baumannii*, que se mantiveram 3x superior ao do soro não infectado (controle negativo) até a titulação de aproximadamente 1:3200 (v/v). Além disso, foi observado que ao realizarmos a incubação da bactéria com os soros de camundongos infectados por *A.baumannii* ocorreu redução da concentração bacteriana nos tempos avaliados (1, 2 e 3 horas). Esta redução ocorreu provavelmente devido ao efeito de neutralização dos anticorpos, uma vez que não avaliamos as funções efetoras do sistema imune (atividade do complemento, opsonização). Além disso, como as infecções hospitalares por *Acinetobacter* spp., são prevalentes em pacientes imunocomprometidos, a ação neutralizante dos anticorpos é considerada importante do ponto de vista terapêutico devido à dificuldade de recrutamento do sistema imune do hospedeiro. Segundo McConnell e Pachón (2011), os anticorpos são suficientes para fornecer imunidade protetora contra infecções por

A. baumannii, podendo ter implicações para o desenvolvimento de futuras terapias baseadas em anticorpos.

Os soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp. (n=50), cujas amostras clínicas analisadas (aspirado traqueal, líquido, sangue, cateter, líquido peritoneal, urina e outros) apresentaram resultado positivo para *Acinetobacter* spp. foram obtidos de centros de saúde e os soros de recém-nascidos não infectados por este patógeno participaram do estudo como controle negativo. De acordo com os resultados do ELISA indireto, foi observado que os pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. apresentaram uma variabilidade quanto ao *cut off* referente aos títulos de anticorpos detectados nos soros dos pacientes contra as proteínas de superfície de *A. baumannii*. Esta variabilidade observada entre os pacientes ocorreu provavelmente devido a alguns fatores que podem influenciar a resposta imune e, em virtude do pouco tempo disponível, não puderam ser analisados neste estudo tais como idade, patologias, outros microrganismos detectados durante a internação, uso de antimicrobianos de amplo espectro, o período entre o diagnóstico da infecção por *Acinetobacter* spp. e a coleta da amostra. Além disso, a variação na expressão dos fatores de virulência do patógeno pode diferir na capacidade das cepas em colonizar ou infectar o ambiente hospedeiro, bem como a virulência intrínseca das diferentes cepas infectantes (Gordon e Wareham, 2010). Portanto, empregamos inicialmente a técnica de *Western blot* com a finalidade de identificar proteínas imunogênicas na membrana externa (OMPs) de *A. baumannii*, e aquelas associadas às vesículas (OMVs) secretadas por este patógeno.

5.3. Comparação das OMPs identificadas através da reação com soros de camundongos e pacientes infectados

As OMPs de *A. baumannii* identificadas através da reação com o soro de camundongos infectados foram comparadas com aquelas que apresentaram reatividade com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. (n=50). Estes resultados sugerem que as OMPs reveladas em maior intensidade com o soro de camundongos infectados, com PMs estimados em 23.000, 31.000, 40.000 e 52.000, foram reativas com 42%, 42%, 88% e 36% dos soros pacientes infectados, respectivamente. Além disso, foi constatado que nenhuma banda eletroforética foi detectada ao realizar a incubação das OMPs com o soro de camundongos não infectados por *A. baumannii*, porém foi observado que o soro de paciente não infectado por *Acinetobacter* spp. reagiu com algumas proteínas de membrana externa. Estes resultados

podem ser esperados, uma vez que existe a possibilidade de ocorrerem reações cruzadas entre as proteínas de outros microrganismos, presentes ou não na microbiota humana. Sendo assim, foi realizada a comparação entre as proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* e *A. baumannii*, com o objetivo de investigar a possibilidade de reação cruzada entre estas bactérias Gram negativas, já que a *E.coli* é o bacilo Gram negativo aeróbio mais freqüente presente na microbiota humana. Através da comparação das OMPs de *E.coli* e *A. baumannii* por SDS-PAGE 12%, de uma forma geral não foram observadas bandas eletroforéticas com o mesmo PM entre as OMPs das duas bactérias analisadas, demonstrando que os perfis das proteínas expressas no gel são diferentes.

Em nosso trabalho, utilizamos como estratégia para a identificação das proteínas imunogênicas de *A.baumannii* nos soros dos pacientes (n=50) e camundongos infectados (n=10), o emprego da técnica de *Western blot*, como triagem inicial para avaliar posteriormente as OMPs identificadas através da revelação com os referidos soros infectados, por eletroforese bi-dimensional, a fim de obter uma melhor caracterização das proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. baumannii*, uma vez que podemos ter proteínas com mesma massa molecular, indistinguíveis por eletroforese unidimensional.

No presente estudo, as principais proteínas de membrana externa de *A.baumannii* foram analisadas por eletroforese bi-dimensional, seguindo sua revelação imunológica pela reação ora com os soros de pacientes infectados, ora com a mistura contendo os soros de camundongos infectados, ambos pela referida bactéria. Isto permitiu uma análise comparativa entre os dois perfis eletroforéticos revelados com soros diferentes. As principais proteínas imunogênicas detectadas no atual trabalho foram caracterizadas de acordo com os dados obtidos por Soares et al (2009) que empregou a mesma metodologia eletroforética, ressaltando que a revelação neste caso ocorreu somente com reagente de prata. De acordo com os resultados obtidos nos nossos experimentos, foi observado que os dois conjuntos de soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp. reagiram com uma proteína de membrana externa com PM estimado entre 38.000 a 40.000 e pI estimado de 5,4. Este resultado sugere que tal proteína seja a OMP que apresentou reatividade anteriormente com 88% dos soros de pacientes infectados (n=50) e também com os soros de camundongos infectados. De acordo com o estudo realizado por Soares et al. (2009), esta proteína identificada em nosso estudo pode ser a precursora de Omp38, da família das OmpA, que está envolvida com o transporte de β -lactâmicos e sacarídeos com massa molecular de até aproximadamente 800 Daltons. Além disso, foi sugerido pelo mesmo autor (Soares et al.,

2009) que esta proteína pode atuar como um fator de virulência potencial induzindo a apoptose de células epiteliais na fase inicial de infecção por *A. baumannii*.

Através da análise da 2D, também foram identificadas em nosso estudo outras proteínas que foram reveladas tanto com o soro de camundongos infectados, como com os soros de pacientes infectados. Entre elas encontramos uma provável porina sensível a glicose (OprB), seletiva para glicídios que atua como um componente central no transporte de glicose, manitol, glicerol e transporte de frutose através da membrana externa e uma provável OMP (com homologia com a Omp 33 -36 kDa) envolvida no transporte de água e carbapenêmicos em *A. baumannii* (Soares et al., 2009). Nós também identificamos uma proteína com PM estimado entre 82.000-84.000 com pI estimado de 5,2 que foi revelada tanto com os soros de camundongos quanto com os de pacientes infectados. Tal proteína não foi caracterizada pela análise proteômica realizada por Soares et al.(2009). Isto provavelmente ocorreu, porque os métodos de revelação utilizados em nosso trabalho e pelo do referido autor foram diferentes. Todavia, um estudo realizado por Goel e Kapil (2001), mostrou que a cepa ATCC19606 de *A. baumannii*, crescida em um meio com restrição de ferro é capaz de expressar em maior intensidade proteínas na faixa de PM entre 79.000 e 88.000 e secretar sideróforos (quelantes de ferro) responsáveis pela captação de ferro do hospedeiro. Tais proteínas são denominadas proteínas de membrana externa receptoras de ferro (IROMPs). Sendo assim, pretendemos realizar estudos posteriores de crescimento bacteriano em condições de restrição de ferro, para melhor avaliarmos a imunogenicidade destas proteínas a partir da reação com os soros dos pacientes infectados por *Acinetobacter* spp.. Também foi detectada através da reação com os dois conjuntos de soros de pacientes infectados uma provável proteína de membrana externa OprD, com PM estimado entre 42.000-44.000 e pI estimado de 9,0, que em *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou estar envolvida na captação de aminoácidos básicos, pequenos peptídeos e imipenem (Soares et al., 2009).

Os fatores de virulência específicos e mecanismos patogênicos desta bactéria permanecem indeterminados. No estudo realizado por Soares et al. (2009), foi identificada a presença de proteínas de membrana externa altamente expressas, como as porinas e chaperonas ou proteínas de choque térmico (HSPs), que provavelmente desempenham um papel crucial, não apenas nos mecanismos de virulência e resistência às drogas, mas também nas respostas de adaptação ambiental, que provavelmente estão relacionadas à persistência do microrganismo no ambiente hospitalar. Assim, esta abordagem proteômica pode nos oferecer novas ferramentas úteis para o desenvolvimento de estratégias baseadas na imunoterapia

contra as infecções por *A.baumannii*, bactéria esta que foi recentemente citada pela *Infectious Diseases Society of America* como um dos seis micróbios mais resistentes às drogas e muito freqüente em hospitais de todo o mundo (Soares et al., 2009).

5.4. Comparação das proteínas associadas às OMVs identificadas através da reação com soros de camundongos e pacientes infectados

Os soros de camundongos infectados por *A.baumannii* apresentaram reatividade com três proteínas associadas às vesículas de membrana externa (OMVs), sendo que uma delas com PM estimado em 42.000 foi considerada a principal banda revelada. Este resultado sugere que a referida proteína apresentou reatividade com 26% dos soros de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter* spp., no total de 50 soros analisados. Contudo deve ser salientado que outras proteínas associadas às OMVs com PM estimado entre 71.000-72.000 e 67.000-68.000 foram reativas com 40% e 38% dos soros de pacientes infectados, respectivamente. A fim de se obter uma melhor caracterização das proteínas associadas às OMVs de *A. baumannii*, foi realizada a eletroforese bi-dimensional e as proteínas imunogênicas foram identificadas por imunorevelação.

As proteínas associadas às OMVs foram incubadas com um conjunto de 15 soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp., selecionados a partir dos resultados obtidos na análise da reatividade dos 50 soros de pacientes infectados com estas proteínas, por *Western blot*. Por este experimento foi identificada uma proteína associada às OMVs que reagiu de forma mais intensa com os soros de pacientes infectados por *Acinetobacter* spp., com PM estimado entre 80.000-82.000 e com valor de pI estimado de 4,5. De acordo com a análise proteômica das OMVs de *A. baumannii*, realizada por Kwon et al. (2009), este resultado sugere que esta OMV está associada à uma proteína de membrana externa receptora de sideróforo férrico que em nosso estudo apresentou reatividade com 24% dos soros de pacientes infectados (n=50) pela referida bactéria. Esta proteína associada às OMVs provavelmente seria a proteína de membrana externa que reagiu com os dois conjuntos de soros de pacientes infectados (Figuras 4.22 e 4.23, *spots* 7), com PM estimado entre 82-84.000 e pI estimado de 5,2, isto é, uma IROMP capaz de secretar sideróforos (quelantes de ferro) responsáveis pela captação de ferro do hospedeiro (Goel e Kapil, 2001). Segundo Kwon et al. (2009), as vesículas derivadas de *A. baumannii* podem carregar componentes protéicos derivados da superfície, incluindo a provável OmpW, uma provável proteína de membrana externa e a hipotética proteína receptora de sideróforo férrico, sendo que a

proteína AbOmpA foi a principal proteína secretada por *A. baumannii* responsável pela adesão e invasão deste patógeno nas células epiteliais. Além disso, segundo este mesmo autor (Kwon et al., 2009), as proteínas associadas à virulência, tais como Omp38, OmpW e bacterioferritina são transportadas em OMVs, provavelmente desempenhando um papel importante durante a infecção *in vivo*.

Em nosso trabalho, a proteína com PM estimado na faixa de 41.000-42.000, a qual apresentou reação imunológica mais forte com os soros de camundongos, foi reativa com 26% dos soros de pacientes infectados e apresentou pI estimado de 5,6. Provavelmente, a referida proteína se refere a uma porina sensível a glicose (OprB). Também identificamos outras proteínas associadas às OMVs como uma proteína receptora de membrana externa (OprC), com PM estimado entre 71.000-72.000 e pI estimado de 6,1, que apresentou reatividade com 40% dos soros de pacientes e outra com PM entre 67.000-68.000 e pI estimado de 5,2, que reagiu com 38% dos soros de pacientes e caracterizada como uma provável proteína de membrana externa receptora de ferro ferricromo. Segundo Kwon et al. (2009), a proteína presente nas OMVs com PM na faixa de 37.000-38.000, que supostamente seria a AbOmpA responsável pela aderência e invasão de *A. baumannii* nas células epiteliais, em nosso estudo reagiu com 4% dos soros pacientes infectados por *Acinetobacter* spp.

Na análise proteômica das OMVs secretadas por *A. baumannii*, realizada por Kwon et al. (2009), foram identificadas 26 proteínas localizadas na membrana externa deste patógeno associadas às vesículas. No nosso estudo, foram detectadas menor número de proteínas (OMVs) provavelmente devido a perdas durante a realização do protocolo de extração das OMVs utilizado. Portanto, pretende-se posteriormente otimizar a técnica de extração destas vesículas com a finalidade de obter maior quantidade de proteínas.

No nosso estudo as principais proteínas imunogênicas localizadas na membrana externa de *A. baumannii*, encontradas através da reação tanto com o soro de camundongos infectados quanto com os soros de pacientes infectados, foram as Omp 38 da família das Omp A, Omp 33 -36 kDa e a proteína receptora de sideróforo férrico (IROMP), que apresentaram reatividade com 88%, 42% e 36% dos soros de pacientes infectados, respectivamente. Como a otimização da eletroforese bi-dimensional exigiu boa parte do tempo de execução do trabalho, não foi possível confirmar a identidade das proteínas estudadas. Sendo assim, estas proteínas de membrana externa serão melhor caracterizadas posteriormente pela técnica de MALDI-TOF/MS, sendo este um método que permite identificar as proteínas por espectrometria de massas. Cumpre salientar que outros estudos

também são necessários sobre a secreção de OMVs durante a infecção *in vivo* e em relação à contribuição das OMVs para o progresso das infecções causadas por *Acinetobacter baumannii*.

Os resultados preliminares obtidos neste estudo representam um primeiro passo para a busca de proteínas alvo capazes de proporcionar o desenvolvimento de estratégias de imunização ativa ou passiva contra infecções causadas por *Acinetobacter baumannii*. Até nosso conhecimento, nenhum estudo de imunoproteômica para *Acinetobacter baumannii* foi publicado, até o momento. Entretanto, é preciso considerar algumas limitações intrínsecas da metodologia por nós empregada, como por exemplo, o fato de o crescimento *in vitro* do patógeno ser diferente das condições reais observadas em um processo infeccioso, implicando em uma provável expressão diferenciada de determinadas proteínas nas diferentes fases da infecção.

6 – CONCLUSÕES

Os estudos efetuados neste trabalho permitiram chegar a um diagnóstico conclusivo de que:

- 1 - As cinco cepas de *A. baumannii* estudadas (539LGB, 549LGB, 305LGB, 356LGB e ATCC19606) apresentaram perfis semelhantes quanto à cinética de crescimento e expressão de proteínas *in vitro*.
- 2 – Os camundongos responderam à infecção por *A. baumannii* gerando título de anticorpos que se mantiveram 3x superior ao do soro não infectado até a titulação de aproximadamente 1:3200 (v/v) e tais anticorpos foram capazes de reduzir a concentração bacteriana (UFC/mL) nos tempos avaliados, provavelmente devido sua atividade neutralizante.
- 3 – O título de anticorpos anti-*Acinetobacter* no soro de pacientes infectados apresentou uma variabilidade quanto ao *cut off* estabelecido neste ensaio, que foi o valor da densidade ótica do soro infectado 3x superior a DO do soro não infectado (controle negativo).
- 4 – As principais proteínas imunogênicas localizadas na membrana externa de *A. baumannii* que foram observadas no atual estudo correspondem às: Omp 38 da família das Omp A, Omp 33 -36 kDa e a proteína receptora de sideróforo férrico (IROMP).

Para darmos continuidade a estes estudos, pretende-se:

- 1 - Identificar a estrutura das proteínas selecionadas através da realização de espectrometria de massas por MALDI-TOF;
- 2 - Confirmar a identidade das proteínas selecionadas através de uma busca no genoma do patógeno (BLAST de proteínas);
- 3 - Uma vez conhecida as seqüências das principais proteínas, realizar o isolamento dos genes correspondentes, clonagem em vetores de expressão, produção e purificação das proteínas recombinantes;
- 4 – Realizar a imunização com as proteínas selecionadas e a avaliação da proteção conferida em modelo murino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtamn AH. **Imunologia Celular e Molecular**. 5nd. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim informativo da rede de monitoramento e controle da resistência microbiana** em serviços de saúde- Ministério da Saúde 2006-2008.

Bergogne BE, Towner KJ. ***Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features**. Clin Microbiol Rev, 1996; (92):148–165.

Carvalho KR, Assef APDC, Peirano G, Santos LCG, Pereira MJF, Asensi MD. **Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil**. Int J Antimicrob Agents, 2009; 34: 25–28.

Coordenadoria geral de vigilância em saúde. **Controle da disseminação de *Acinetobacter sp.* resistente a carbapenêmicos no município de Porto Alegre**. Porto Alegre; 2007. [Manual de Orientação] – Prefeitura de Porto Alegre.

Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. **Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers**. Emerg Infect Dis, 2005; 11(8):1218–24.

Dijkshoorn L, Memec A, Seifert H. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***. Nat Microbiol Rev, 2007; 5: 940.

Falagas ME, Kopterides P. **Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature**. J Hosp Infect, 2006; 64(1):7-15.

Gaynes R, Edwards JR. **Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli**. Clin Infect Dis, 2005; (15) 41: 848-854.

Goel VK, Kapil A. **Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal**. Microbiology, 2001; 1:16.

Gomes MJVM, Reis AMM. **Ciências Farmacêuticas: Uma Abordagem em Farmácia Hospitalar**. 1nd. ed. São Paulo: Atheneu; 2003.

Gordon NC, Wareham DW. **Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance**. Int J Antimicrob Agents, 2010; 35: 219-226.

Guillou MLJ. **Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter***. Clin Microbiol Infect, 2005; 11: 868-873.

- Gusatti CS, Ferreira AE, Fuentefria DP, Corção G. **Resistência a β -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009; 42: 183-187
- Jennifer HO, Tambyah PA, Paterson DL. **Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective.** Infect Dis, 2010; 23: 1-7.
- Jones RN, Ferraro MJ, Reller LB, Schreckenberger PC, Swenson JM, Sader HS. **Multicenter Studies of Tigecycline Disk Diffusion Susceptibility Results for *Acinetobacter* spp.** J Clin Microbiol, 2007; 45(1): 227-230.
- Kittelberger R, Hansen MF, Hilbink F, Lisle GW, Cloeckert A. **Selective extraction of bacterial macromolecules by temperature-induced phase separation in Triton X-114 solution.** Journal of Microbiological Methods, 1995; 24: 81-92.
- Kurupati P, Teh BK, Kumarasinghe G, Poh CL. **Identificação of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis.** Proteomics, 2006; 6: 836-844.
- Kwon SO, Gho YS, Lee JC, Kim SL. **Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate.** Microbiol Lett, 2009; 297: 159-156.
- Läemmlli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.** Nature, 1970; 227: 680-685.
- Lin YC, Sheng WH, Chang SC, Wang JT, Chen YC, Wu RJ, Hsia KC, Li SY. **Application of a Microsphere-Based Array for Rapid Identification of *Acinetobacter* spp. with Distinct Antimicrobial Susceptibilities.** J Clin Microbiol, 2008; 46(2): 612-617.
- Lopéz JL. **Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis.** J. Chromatogr 2007; 849: 190-202.
- Machado PRL, Araújo MIA, Carvalho L, Carvalho EM. **Immune response mechanisms to infections.** An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 2004; 79(6): 647-664.
- McConnell MJ, Pachón J. **Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine.** Vaccine, 2011; 29: 1-5.
- Mostachio AKQ. **Caracterização de carbapenemases e proteínas de membrana externa de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos isolados de sangue.** São Paulo; 2010. [Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias] - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson D. ***Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen.** Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3): 538-82.
- Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. **Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrob Agent Chemo, 2007; 51(10): 3471-3484.

Peterson GL. **Determination of total protein.** In **Methods in Enzymology.** Enzyme Structure -Part I, 1983; 91 (12): 95-105.

Queenan AM, Bush K. **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.** Clin Microbiol Rev, 2007; 20 (3): 440-58.

Russo TA, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Luke NR, Gill SR, Campagnari AA. **Rat Pneumonia and Soft-Tissue Infection Models for the Study of *Acinetobacter baumannii* Biology.** Infect Immun, 2008; 76 (8): 3577-3586.

Silva Jr. JG. **Eletroforese de proteínas. Guia teórico e prático.** Rio de Janeiro: Interciência; 2001.

Siroy A, Cosette P, Seyer D, Guillier CL, Vallenet D, Dorsselaer AV, Mariotte SB, Jouenne T, Dé E. **Global Comparison of the Membrane Subproteomes between a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain and a Reference Strain.** J Proteome Res, 2006; 5 (12): 3385-3398.

Soares NC, Cabral MP, Parreira JR, Gayoso C, Barba MJ, Bou G. **2-DE analysis indicates that *Acinetobacter baumannii* displays a robust and versatile metabolism.** Proteome Science, 2009; 7 (37): 1-10.

Towbin H, Staechelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci, 1979; 76: 4350-4.

Towner KJ. **Therapeutic options for infections caused by *Acinetobacter baumannii*.** Antibiotiques, 2009; 11:150—7.

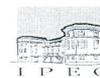
Vila J, Martí S, Sánchez Céspedes J. **Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*.** J Antimicrob Chemother, 2007; 59 (6): 1210-05.

Villegas MV, Hartstein AI. ***Acinetobacter* outbreaks.** Infect Control Hosp Epidemiol, 2003; (24): 284-95.

Vincent JL, Rello J, Marshall J. **International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units.** JAMA, 2009; 302 (21): 2323-2329.

ANEXOS

Anexo 1: Documento de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 015/2010

Protocolo 0004.0.009.000-10

1. Identificação:

Título do Projeto: "Identificação de proteínas imunogênicas em modelo animal e em pacientes infectados ou colonizados com *Acinetobacter spp.*".

Pesquisador Responsável: José Procópio Moreno Senna (Bio-Manguinhos).

Instituição Responsável: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

Data de Apresentação ao CEP: 04/02/2010.

2. Sumário:

O objetivo principal deste projeto consiste na identificação de proteínas imunogênicas observadas em modelo animal e em pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter sp.*, que possibilitará a avaliação de novos alvos para o desenvolvimento de estratégias baseadas em imunoterapia. Tem como objetivo específico: 1) Avaliação dos perfis de anticorpos produzidos em modelo murino infectados com diferentes cepas de *Acinetobacter sp.*. A análise da presença de anticorpos será feita pela técnica de immunoblotting; 2) Avaliação dos perfis de anticorpos produzidos em soros de pacientes hospitalizados infectados ou colonizados com *Acinetobacter sp.*; 3) Caracterização das proteínas imunodominantes por eletroforese bidimensional (2D); 4) Sequenciamento da região n-terminal das principais proteínas selecionadas; busca da sequência completa das proteínas correspondentes no Gene Bank (NCBI) e o isolamento dos genes correspondentes, clonagem em vetores de expressão, produção das proteínas recombinantes para ensaios posteriores de imunização e avaliação da proteção conferida em modelo murino. Serão obtidas cepas *Acinetobacter baumannii* obtidas junto a Colação de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde do Instituto Oswaldo Cruz – IOC, isoladas a partir de material clínico e uma cepa padrão (*A. baumannii* ATCC 19606). As amostras de soro de pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter sp.* serão selecionadas a partir de soros do Laboratório Richet que vão para o descarte após a realização de exames bioquímicos e/ou hematológicos, não sendo identificados.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Em substituição ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram elaborados Termos de Compromisso, onde os colaboradores comprometem-se a não revelar a identidade dos pacientes do projeto em qualquer publicação resultante deste estudo, protegendo sua confidencialidade. Este estudo faz parte de um projeto de desenvolvimento de Imunoterapia anti-*Acinetobacter spp.*, baseado na identificação de proteínas imunogênicas observadas em modelo animal e em pacientes infectados ou colonizados por *Acinetobacter sp.* do Programa de Biofármacos da VDTEC (Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico) de Bio-Manguinhos.

"Identificação de proteínas imunogênicas em modelo animal e em pacientes infectados ou colonizados com *Acinetobacter spp.*".

4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 23 de março de 2010.

Assinatura do Coordenador:

Liza Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
0004.0.009.000-10

Anexo 2: Documento de aprovação para realizar infecção por *Acinetobacter* spp. em modelo murino.



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice-presidência de Pesquisa e
 Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
 no Uso de Animais

LICENÇA

LW-7/11

Certificamos que o protocolo (P-47/10-3), intitulado "Desenvolvimento de um modelo animal (murino) para infecção por *Acinetobacter* spp. e em outras bactérias causadoras de infecção hospitalar", sob a responsabilidade de JOSÉ PROCÓPIO MORENO SENNA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2014 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 40 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 8 Semana(s), Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2010

Octavio Augusto França Presgrave
 Coordenador da CEUA

Anexo 3: Documento de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUAP



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro

Herbert Praxedes - **Coordenador Geral**
Representante Comunidade Científica

Alair Augusto Santos / Maria Lúcia Santos
Faculdade de Medicina - Depto Radiologia

Maria Nazareth C. Pinto / Alberto Esteves Gemal
Faculdade de Medicina - Depto Cirurgia

Renato Augusto M. Sá / Selma Maria A. Sias
Faculdade de Medicina - Depto Materno Infantil

Regina Helena S. Peralta / Andréa Alice da Silva
Faculdade de Medicina - Depto Patologia

Jano Alves de Souza / Pedro Ferreira M. Filho
Faculdade de Medicina - Depto Medicina Clínica

José Carlos Carraro Eduardo
Faculdade de Medicina – Repr. Colegiado

Carlos Dimas M.Ribeiro/Marcos Antônio A.Senna
Instituto de Saúde da Comunidade

Sérvio Túlio / Rogério Dultra
Faculdade de Direito

Ana Paula Black Veiga
Hospital Universitário Antônio Pedro

Rosângela Arrabal Thomaz
Faculdade de Medicina

José Plácido / Lígia Lobato
Representantes da Comunidade Usuária

Tereza C. A. Graça / Theresa C.L. Coutinho
Faculdade de Odontologia

Thelma B. Machado / Sabrina C. Elias
Faculdade de Farmácia

Denise Mafra / Daniele M. Ferreira
Faculdade de Nutrição

Valdecyr Herdy Alves / Luiz dos Santos
Faculdade de Enfermagem

Dilvani Oliveira Santos / Luiz G. Gawryszewski
Faculdade de Biologia

Tatiana Rangel Reis / Sulamita B. de Lima
Escola de Serviço Social

Luís Antônio C. Ribeiro / Gilvan Hansen
Instituto de Ciências Sociais – Depto Filosofia

Josemberg M. Andrade / Elton H. Matsushima
Instituto de Ciências Sociais – Depto Psicologia

Licínio E. Silva / Ana Beatriz M. Fonseca
Instituto de Matemática

CEP CMM/HUAP nº 066/2010

CAAE nº 0051.0.258.000-10

Do: Coordenador do CEP CMM/HUAP
 A(o) Sr.(a) Pesquisador(a):

Assunto: Parecer sobre Projeto de Pesquisa

Sr.(a) Pesquisador(a)

Informo a V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro, constituído nos termos da Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa e seu respectivo Termo de Consentimento Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Título do Projeto:

“Pesquisa de proteínas imunogênicas em pacientes infectados ou colonizados por Acinetobacter spp”

Pesquisadora Responsável:
José Procópio Moreno Senna

Pesquisadores Colaboradores:
Renata Fajardo Bonin

Data: 07/05/2010

Parecer: **Aprovado**

Atenciosamente,

Prof. Herbert Praxedes
 Coordenador