



Investigação molecular da infecção aguda e tardia por *Bartonella henselae* em camundongos

Bolsista CNPq: Gabriel Rabelo de Araujo / RA: 197490
Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

1. Introdução

Consideradas como patógenos emergentes, as bactérias do gênero *Bartonella* são adaptadas para infectar mamíferos e estabelece infecções intraeritrocitárias de longa duração em reservatórios preferencias como o ser humanos e os gatos. São bactérias bacilares gram-negativas, intracelulares facultativas, tendo como uma importante forma de transmissão os vetores hematófagos (1).

Na literatura são propostas pelo menos 47 espécies e subespécies do gênero *Bartonella*. Três espécies são responsáveis pela maior parte dos sintomas clínicos em humanos: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*. Em pacientes imunodeficientes a infecção poder ser mais grave, causando manifestações potencialmente fatais (2).

As bartonelas são bactérias fastidiosas e, mesmo atendendo às suas exigências, raramente são isoladas. A definição de sua infecção é complexa, pois não existe um diagnóstico padrão ouro com sensibilidade e especificidade adequadas (3).

A *B. henselae* é a espécie causadora da doença da arranhadura do gato (DAG), comumente encontrada nos humanos. Sabe-se que uma das características dessa espécie é a invasão de eritrócitos humanos (4).

Foram realizados dois projetos com o objetivo de investigar a presença dessa bactéria em diferentes tecidos. O primeiro projeto “Pesquisa de *Bartonella henselae* no sistema nervos central e coração de camundongos infectados experimentalmente”, feito no ano de 2018, apresentou resultados pouco compreensíveis, pois houve positividade em animal controle. Desta forma, buscando resultados mais claros, foi feito um novo experimento translacional em camundongos imunodeficientes a fim de investigar a proliferação da bactéria em oito tecidos diferentes: sangue, cérebro, coração, fígado, baço, rim, pele, olho e cérebro.

2. Metodologia

• Projeto de 2018-19

Os tecidos utilizados nesse trabalho foram provenientes de um projeto de doutorado anterior (Silva. M.N., 2016). Foram utilizadas amostras de coração e cérebro provenientes de 16 fêmeas de camundongos isogênicos imunocompetentes BALB/c, com oito semanas de idade e peso entre 20 e 22 gramas. Os camundongos foram separados em dois grupos de oito animais: o grupo controle (GC) no qual foi realizado inoculação intraperitoneal de solução salina e o grupo infectado (GI) no qual inoculou-se suspensão bacteriana (10^4 UFC de *B. henselae* /mL). A suspensão foi preparada com cepa padrão de *B. henselae* (Houston 1, American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC 49882T). Metade dos animais de cada grupo foi eutanasiado para coleta de amostras 4 dias após a inoculação e o restante



após 21 dias. As amostras estavam armazenadas no freezer -80°C , garantindo sua preservação (5).

Para extração do DNA dos tecidos foi utilizado um protocolo adaptado que se baseia-se na lise por SDS e proteinase K e na precipitação NaCl e álcool (6). O DNA foi quantificado no Multiskan GO, Thermo scientific. Todas as amostras foram submetidas para reação de PCR controle para região GAPDH, PCR convencional para *Bartonella sp.* baseado na região ITS e PCR *nested* (de dupla amplificação) espécie-específica para *B. henselae* para a região *ftsZ*. Todas as amostras que apresentaram amplificação foram levadas a sequenciamento por uma empresa terceirizada.

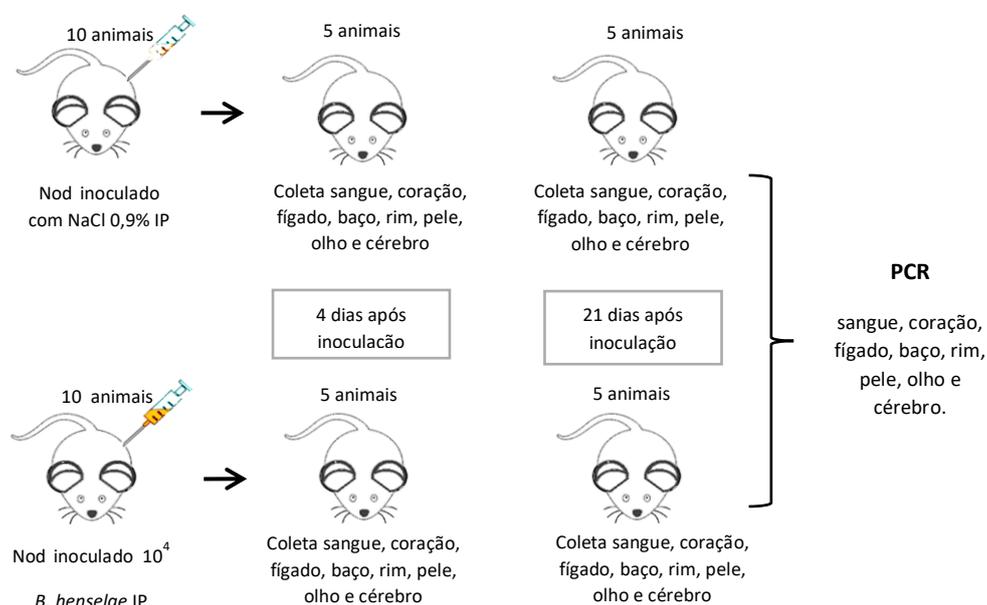
• Projeto de 2019-20

Nesse estudo foram utilizados 20 camundongos imunodeficientes da linhagem NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib. Os animais foram separados em dois grupos de 10 animais: no grupo controle (GC) foi inoculado intraperitonealmente $30\mu\text{L}$ de solução salina e no grupo infectado (GI) foi inoculado uma suspensão bacteriana (10^4 UFC de *B. henselae* /mL), suspensão preparada com cepa padrão de *B. henselae* (3715 IAL) em solução salina 0,9%. Metade dos animais de cada grupo foi eutanasiado para coleta de amostras 4 dias após a inoculação e o restante após 21 dias. A eutanásia foi realizada com os devidos cuidados, em cabine de segurança biológica, iniciando-se pelo grupo controle e seguindo para o infectado.

Após a coleta dos tecidos foi realizado a extração do DNA utilizando o Kit de extração Omega (Extração de DNA de Cultura Celular e Tecido, Kit E.Z.N.A.® #D3396), seguindo o protocolo. Todas amostras foram quantificadas em NanoDrop a fim de se verificar a quantidade e qualidade do DNA extraído. Após a extração, foram realizadas as mesmas reações de PCR já descritas no projeto anterior, além de PCR em tempo real para a região *gltA*.

Na reação de PCR *nested* foi necessário fazer diluições do DNA em alguns dos tecidos, pois ao utilizar-se o DNA diretamente para a amplificação, houve a visualização de várias bandas inespecíficas. A mesma diluição foi utilizada nos grupos controle e infectados, sendo elas: coração, cérebro e olho 1:3; fígado e baço 1:4. A figura 1 resume o experimento.

Figura 1. Estratégia de inoculação do animal e esquema de coleta de amostra.





3. Resultados/Discussão

• Projeto de 2018-19

O método de extração *in house* padronizado mostrou-se eficiente e foi importante para o laboratório, uma vez que o custo com o método é substancialmente menor quando comparado ao *kit* comercial.

Nas reações realizadas tivemos os seguintes resultados: na PCR GAPDH todas as amostras apresentaram amplificação, demonstrando DNA íntegro e ausência de inibidores; nas reações convencional e *nested* foi necessário realizar a diluição do DNA, devido à alta concentração. No tecido cardíaco, as duas reações apresentaram amplificação nas amostras (GC Camundongo 1-4 dias e GI Camundongo 4-4 dias). A amostra do grupo infectado foi sequenciada e confirmou se tratar de *B. henselae*. Nos tecidos de cérebro houve amplificação de DNA de *B. henselae* nas amostras GC Camundongo 1- 21 dias e GI Camundongo 1-21 dias), resultado que foi confirmado por sequenciamento. A partir da detecção do DNA de *B. henselae* no grupo controle, houve a necessidade de um novo experimento com o objetivo de esclarecer se houve equívoco no armazenamento das amostras ou se, eventualmente, mesmo animais livres de patógenos como os utilizados no experimento estariam infectados por essa bactéria.

• Projeto de 2019-20

A quantificação das amostras demonstrou que as extrações realizadas foram eficientes e de boa qualidade pois os valores médios de concentração e razão 260/280 de DNA foram adequados. Todas as amostras extraídas apresentaram amplificado na PCR controle (GAPDH), ou seja, o DNA extraído mostrou-se íntegro e com ausência de inibidores da PCR. O quadro 1 resume os resultados de todas as reações nos dois grupos.

Quadro 1. Resultados PCR dos dois grupos

Animais Controle									
4 dias		Sangue	Coração	Fígado	Baço	Rim	Pele	Cérebro	Olho
Camundongo	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	+Nested	+Nested	—	—	—	+RT
	5	—	—	—	+Nested	—	+Nested	—	—
21 dias									
Camundongo	1	—	+Nested	+Nested	+Nested	—	+Nested	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	+Nested	—	—	—	—
	4	—	+Nested	—	+Nested	—	—	+Nested	—
	5	—	—	—	—	—	—	+RT	—
Animais Infectados									
4 dias		Sangue	Coração	Fígado	Baço	Rim	Pele	Cérebro	Olho
Camundongo	1	—	—	—	+Nested	—	+Nested	—	—
	2	—	—	—	+Nested	+Nested	—	—	—
	3	—	+Nested +Conv	—	+Nested	+Nested	—	—	—
	4	—	—	+Nested	+Nested	—	+Nested	—	—
	5	—	—	+Nested	+Nested	+Nested	—	—	—
21 dias									
Camundongo	1	—	+Nested	+Nested	+Nested	+Nested	—	—	—
	2	—	—	—	+Nested	—	—	—	+Conv
	3	—	—	—	+Nested	—	—	—	—
	4	—	+Nested	—	+Nested	—	—	—	+Nested
	5	—	+Nested	—	+Nested	+Nested	—	+Nested	—

+Nested: Amplificação na PCR *nested*

+Conv: Amplificação na PCR convencional

+RT: Amplificação na PCR em tempo real



Entre os resultados obtidos pelas reações, tem-se na PCR convencional para região ITS, gênero específica, duas amostras amplificadas, pertencentes ao grupo dos infectados. Os dois animais positivos nas reações convencionais também tiveram infecção demonstrada pela PCR *nested*.

As reações de PCR *nested* apresentaram maior número de ampliações em relação às outras reações. Isso é compreensível por se tratar de uma reação de dupla amplificação, o que a torna mais sensível para detecção. Considerando todas as amostras houve amplificação em 12 animais do grupo controle e em 26 dos camundongos infectados.

As amostras amplificadas permitem identificar a infecção da bactéria em todos os tecidos analisados. Os tecidos coração, fígado, baço e rim apresentaram mais ampliações, o que sugere que sejam mais infectados. Uma explicação para esses resultados é que, por se tratar de órgãos altamente vascularizados, ficam mais propensos de receber eritrócitos infectados permitindo a proliferação da bactéria (7).

A PCR em tempo real apresentou amplificação em duas amostras (cérebro e olho) em animais pertencentes ao grupo controle. O pequeno número de ampliações nessas reações pode ter ocorrido por uma baixa quantidade de DNA do patógeno, o que faz com que o limite de detecção não seja alcançado, impossibilitando a verificação da infecção, mas não significa a ausência da bactéria (8).

No trabalho realizado observa-se à amplificação em amostras do grupo controle, em mais de uma reação. Esses resultados podem significar que animais, a princípio considerados livres de patógenos específicos como os provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (Cemib) da Unicamp, possam estar infectados por estas bactérias. Esse processo pode ter ocorrido por meio de uma infecção transplacentária, em que o camundongo inicial que deu a origem a linhagem, apresentava essas bactérias e que foram transmitidas através das gerações. Os animais não são testados para a infecção por *Bartonella* spp. e esse tipo de transmissão já foi verificado em outro estudo, corroborando para esse achado (9).

A existência de camundongos infectados fornecidos para experimentos é problemática, pois a bactéria pode afetar em vários aspectos o organismo contaminado e consequentemente influenciar nos resultados. Na literatura não é descrito a contaminação de animais de experimentação por essas bactérias.

4. Conclusão

Nesse trabalho pode-se observar a potencialidade de infecção que a bactéria *B. henselae* possui. Dentre as reações realizadas, a PCR *nested*, espécie-específica, apresentou maior sensibilidade na detecção, apresentando amplificação em 34 amostras entre controles e infectados. A reação PCR em tempo real, que possui uma sensibilidade relevante, apresentou amplificação em duas amostras para o grupo controle, sendo pertencentes aos tecidos de cérebro e olho. Na PCR convencional para região ITS o DNA de *Bartonella* sp. foi detectado em uma amostra de olho e outra do coração do grupo infectado.



Como é mencionado na literatura, no presente estudo pode-se verificar que os tecidos com uma maior vascularização são mais propensos em abrigar essas bactérias, como é visto em resultados no baço, rim, coração e fígado.

Na investigação experimental da infecção em camundongos também houve a identificação de contaminação por *Bartonella* sp. dos animais controles, o que estabelece a necessidade de medidas avaliativas pelos responsáveis em fornecimento dessa linhagem de camundongos para que haja segurança na realização de pesquisas que utilizem esses organismos.

Esforços nos métodos de diagnósticos são necessários visto que ainda não se possui uma sensibilidade adequada para identificar *Bartonella* sp.

Referências

1. Chomel BB, Boulouis H-J, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of Bartonella species to their hosts and vectors I. Vet Res [Internet]. 2009;40:29. Available from: www.vetres.org
2. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2014 [cited 2018 Oct 22];44:16–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006>
3. Helena L, Pitassi U, Vissotto De Paiva Diniz PP, Gerardi D, 3ª S, Drummond MR, et al. Bartonella spp. Bacteremia in Blood Donors from Campinas, Brazil. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 23];9(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4295888/pdf/pntd.0003467.pdf>
4. Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of Bartonella spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/36/3/563/634924>
5. MARILENE NEVES DA SILVA Estudo translacional sobre a infecção por Bartonella henselae e sua transmissão transfusional Translational research about infection by Bartonella henselae and its transfusion transmission.
6. Parpinelli RS, Ribeiro RP. Estudo Comparativo De Protocolos De Extração De Dna Em Diferentes Tecidos De Tilápia Do Nilo (Oreochromis Niloticus). Gl Sci Technol. 2009;2(1):22–33.
7. Pagliuca C, Cicatiello AG, Colicchio R, Greco A, Cerciello R, Auletta L, et al. Novel approach for evaluation of Bacteroides fragilis protective role against Bartonella henselae liver damage in immunocompromised murine model. Front Microbiol. 2016;7(NOV):1–12.
8. Wilson IG. MINIREVIEW Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Vol. 63, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1997.
9. Boulouis HJ, Barrat F, Bermond D, Bernex F, Thibault D, Heller R, et al. Kinetics of Bartonella birtlesii Infection in Experimentally Infected Mice and Pathogenic Effect on Reproductive Functions. Infect Immun [Internet]. 2001 Sep 1;69(9):5313 LP – 5317. Available from: <http://iai.asm.org/content/69/9/5313.abstract>