VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS COMO POTENCIAIS TRANSMISSORES DE *BARTONELLA* spp.

Palavras-Chave: Camundongos Endogâmicos BALB C, Bartonella, Reação em Cadeia da Polimerase

Autores/as:

SAYROS AKYRO SOARES MARTINS [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

MARINA ROVANI DRUMMOND [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

LUCIENE SILVA DOS SANTOS [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

GABRIEL RABELO DE ARAUJO [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

Prof. Dr. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO [FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS]

INTRODUÇÃO

As bartoneloses são doenças negligenciadas causadas por bactérias gram-negativas, fastidiosas e pertencentes ao gênero *Bartonella*. Estas bactérias têm uma ampla capacidade de infectar mamíferos e sua transmissão muitas vezes está relacionada a vetores. Atualmente este gênero apresenta mais de 45 espécies e subespécies das quais pelo menos 16 estão relacionadas a doenças em humanos. Vários artrópodes hematófagos como pulgas, piolhos, mosquitos e carrapatos já foram confirmados como vetores. Um estudo mostrou que pacientes com cardiopatias chagásicas tem 40 vezes mais chances de estarem infectados com *Bartonella* sp. em relação ao grupo controle saudável. Diante destes dados, sugere-se que os percevejos hematófagos da família dos triatomíneos e vetores da doença de Chagas possam ser potenciais vetores de *Bartonella* spp.. O resultado deste projeto pode sugerir que os pacientes chagásicos sejam testados para este outro patógeno que também podem causar cardiomiopatias. Resultados obtidos em outro projeto, com o objetivo investigar a proliferação de *B. henselae* em oito tecidos diferentes de camundongos imunodeficientes (sangue, coração, fígado, baço, rim, pele, olho e cérebro), em infecção aguda (4 dias) e tardia (21 dias), realizado concomitantemente a este, revelaram a presença DNA de *Bartonella henselae* em vários animais do grupo controle. Os animais utilizados eram de uma linhagem imunossuprimida (NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib) e para o presente projeto estava prevista a utilização de animais BALB/C com o objetivo de avaliar o potencial vetorial de triatomíneos infectados experimentalmente por *Bartonella henselae* para camundongos sem infecção por estas bactérias. Para avaliar se esta linhagem também estaria infectada com *Bartonella* sp., foi realizada a eutanásia de 10 animais retirados diretamente do biotério para o sacrifício. Foram coletadas amostras dos seguintes tecidos: sangue, pele, baço, fígado, coração, olho, rim, intestino,

esôfago e cérebro. Para detecção do patógeno foram utilizadas ferramentas de detecção molecular como PCR convencional, PCR de dupla amplificação e PCR em tempo real.

METODOLOGIA

O planejamento inicial do projeto em questão tratava-se de alimentar insetos barbeiros com sangue infectado por cepa padrão de *B. henselae,* fornecer os camundongos Balb/c como fonte de alimento para tais percevejos, realizar a eutanásia de tais roedores, coletar as amostras de baço e fígado desses e analisar a presença ou não de *B. henselae* nestes órgãos.

No entanto, para surpresa da nossa equipe, por meio da análise dos grupos controle através de PCR, foi detectada a presença de *Bartonella sp.* nos próprios barbeiros obtidos para os experimentos, antes mesmo da fase de alimentação por sangue contaminado.

Resultados obtidos em outro projeto com o objetivo investigar a proliferação de *B. henselae* em oito tecidos diferentes de camundongos imunodeficientes (sangue, coração, fígado, baço, rim, pele, olho e cérebro), em infecção aguda (4 dias) e tardia (21 dias), realizado concomitantemente a este, revelaram a presença DNA desta bactéria em vários animais do grupo controle. Os animais utilizados eram de uma linhagem imunossuprimida (NOD.CB17-Prkdcscid/JUnib) e para o presente projeto estava prevista a utilização de animais BALB/C. Para avaliar se esta linhagem também estaria infectada com *Bartonella* sp., foi realizada a eutanásia de 10 animais retirados diretamente do biotério (Cemib - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório) para o sacrifício. Foram coletadas amostras dos seguintes tecidos: sangue, pele, baço, fígado, coração, olho, rim, intestino, esôfago e cérebro.

A extração de DNA foi realizada por *kit* comercial Qiagen (Qiagen DNA Mini *Kit*) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi realizada por meio do equipamento Nanodrop.

Além da quantificação em Nanodrop, todas amostras foram testadas por PCR convencional para amplificação de um gene constitutivo (GAPDH)[1]. Tal reação tem por finalidade verificar a qualidade do DNA extraído e certificar a inexistência de inibidores de amplificação.

Em seguida foi realizada a PCR de dupla amplificação (*nested*) região *ftsZ*, específica para *B. henselae*[2] além de PCR convencional e PCR em tempo real no sistema Sybr® Green utilizando a enzima Fast SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) utilizando *primers* para amplificação do gene da citrato sintase (*gltA*)[3]. Neste estudo, os

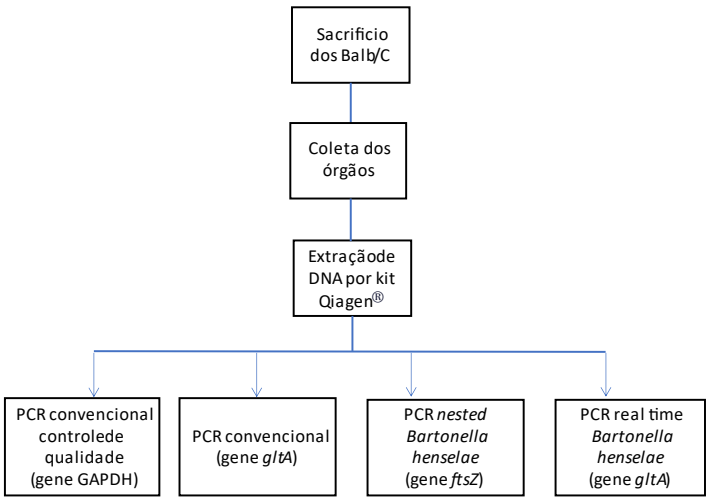

Figura 1 – Protocolo de processamento das amostras

resultados da PCR em tempo real foram utilizados como PCR qualitativo, considerando os resultados como positivos ou negativos.

RESULTADOS

Quantificação por Nanodrop

A quantidade de DNA extraído é expressa pelo equipamento em nanogramas por microlitro. Sendo assim, quanto maior este número, maior é a quantidade de DNA na amostra analisada.

A razão entre absorbâncias medidas a 260nm e 280nm é a forma mais conhecida de controle de qualidade de uma extração de DNA ou RNA. De forma generalizada, o resultado da divisão destas absorbâncias expressa a proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídos[4]. A pureza 260/280 é dada de forma que, quanto mais próxima de 1,8, maior é a pureza do ácido nucleico.

A razão 260/230 pode indicar contaminação com diversos compostos. Os valores almejados estão geralmente entre 1,8 e 2,2, um pouco acima de seus respectivos valores 260/280.

As quantificações, por Nanodrop, do DNA extraído por *kit* comercial Qiagen se mostraram dentro dos intervalos de valores esperados em todos os órgãos analisados.

Tecido	Concentração (ng/µL)		260/280		260/230	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Sangue	2,5	34,8	1,34	2,52	0,13	1,27
Pele	18,2	140,4	1,84	1,95	1,85	3,45
Baço	14,7	476	1,77	2,07	1,65	3,07
Fígado	113,2	232,4	1,96	2,02	1,97	2,34
Coração	23	99,9	1,75	2,03	1,38	3,25
Rim	6	221,8	1,83	2,33	0,53	1,98
Cérebro	12,8	127,2	1,78	2,03	0,57	2,09
Esôfago	7,1	61,4	1,61	2,01	0,31	1,5
Intestino	4,8	41,7	1,61	2,19	0,31	1,28
Olho	99,5	463,8	1,77	1,85	1,59	2,09

Tabela 1 – Valores máximos e mínimos das amostras coletadas obtidos por Nanodrop

PCR gene constitutivo (GAPDH)

Todas as amostras apresentaram amplificação, ou seja, a inexistência de inibidores de amplificação e a presença de DNA íntegro.[1]

PCR *nested* e PCR em tempo real

Em todas as amostras foi realizado PCR de dupla amplificação (*nested*) espécie-específica para *B.* henselae. Determinadas amostras de diferentes órgãos apresentaram bandas de tamanho equivalente a 218 pares de bases, valor referência para *Bartonella henselae* na segunda reação da PCR *nested*.[2]

Também foi realizado PCR em tempo real qualitativo nas amostras de cérebro, olho, rim, intestino, esôfago e sangue.

Animal	Sangue	Pele	Baço	Fígado	Rim	Intestino	Esôfago	Olho	Coração
Balb 1	**-**	**-**	**+ Nested**	**+ Nested**	**+ RT**	**-**	**-**	**+ RT + Nested**	**-**
Balb 2	**-**	**-**	**-**	**-**	**+ Nested**	**-**	**-**	**-**	**-**
Balb 3	**-**	**-**	**-**	**+Nested**	**-**	**+Nested**	**-**	**-**	**-**
Balb 4	**+ RT**	**-**	**+ Nested**	**-**	**+ RT**	**-**	**-**	**+ RT + Nested**	**-**
Balb 5	**+ RT + Nested**	**-**	**+ Nested**	**-**	**+ RT + Nested**	**-**	**-**	**-**	**-**
Balb 6	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+ RT + Nested**	**-**
Balb 7	**-**	**-**	**+ Nested**	**+ Nested**	**-**	**+ Nested**	**-**	**-**	**-**
Balb 8	**+ RT**	**-**	**-**	**-**	**+ RT**	**-**	**-**	**-**	**-**
Balb 9	**+ RT + Nested**	**-**	**-**	**-**	**+ RT + Nested**	**+ Nested**	**-**	**-**	**-**
Balb 10	**-**	**-**	**+ Nested**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**

Tabela 2 – Resultado das PCR dos BALB/C analisados

(+Nested) Amplificação PCR Nested, (+ RT) Amplificação na PCR em tempo real

Os amplificados da segunda reação da PCR *nested* das amostras de baço dos animais 4, 7 e 10 foram enviadas para sequenciamento e apresentaram 100% de similaridade com *B. henselae* (Bartonella henselae strain Houston-I chromosome, complete genome CP020742.1). Os demais amplificados que tenham a concentração e a qualidade requisitadas para sequenciamento Sanger serão enviadas para sequenciamento e confirmação da presença de DNA de *B. henselae*.

Os amplificados da PCR CS serão concluídos e seus resultados incluídos no artigo final deste projeto.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram a presença de DNA de *B. henselae* nos animais da linhagem BALB/C obtidos no CEMIB., Todos os dez animais testados apresentaram amplificação em pelo menos um dos órgãos e em três destes animais houve a confirmação por sequenciamento.

A existência de camundongos infectados fornecidos para experimentos é problemática, pois a bactéria pode afetar vários aspectos do organismo contaminado e, consequentemente, influenciar nos resultados do projeto em que estes animais serão utilizados. Há a necessidade de mais estudos para a compreensão e a confirmação de infecção natural em animais de experimentação por bactérias do gênero *Bartonella*. Não foram encontrados outros trabalhos relatando a contaminação de animais de experimentação por estas bactérias.

É possível que a infecção natural desses animais tenha se dado por via transplacentária de matrizes obtidas das empresas estrangeiras que fornecem os animais para Centros de Bioterismo em vários países, já que a pesquisa destas bactérias em animais experimentais ainda não foi demonstrada.

CONCLUSÕES

A presença de DNA de *B. henselae* foi detectada em todos os dez camundongos da linhagem BALB/C provenientes do Cemib da Unicamp. É necessária a realização de novos estudos para elucidar o impacto desta contaminação nos projetos que utilizam esta linhagem, além de novas investigações nas demais linhagens oferecidas pelo biotério aos grupos de pesquisa.

BIBLIOGRAFIA

1. **Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol 2003;41:4172-7.**

2. **Kawasato KH, de Oliveira LC, Velho PE, Yamamoto L, Del Negro GM, Okay TS. Detection of Bartonella henselae DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2013;55: 1-6.**

3. **Staggemeier R, Pilger DA, Spilki FR, Cantarelli VV. MULTIPLEX SYBR® GREEN-REAL TIME PCR (qPCR) ASSAY FOR THE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF Bartonella henselae AND Bartonella clarridgeiae IN CATS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(2):93-5.**

4. **Desjardins PC, Deborah. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. JoVE (Journal of Visualized Experiments) 2010.**