

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISADORA DE CÁSSIA GARREFA

**Expressão e purificação da *Outer membrane protein A* (OmpA) de *Rickettsia rickettsii*  
expressa em sistema bacteriano**

Uberlândia, Minas Gerais

Junho / 2023

ISADORA DE CÁSSIA GARREFA

**Expressão e purificação da *Outer membrane protein A (OmpA)* de *Rickettsia rickettsii*  
expressa em sistema bacteriano**

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de bacharel em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Coorientadora: Mayara Garcia Polli

Uberlândia, Minas Gerais

Junho / 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Expressão e purificação da *Outer membrane protein A* (OmpA) de *Rickettsia rickettsii*  
expressa em sistema bacteriano**

Isadora de Cássia Garrafa

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_.

---

Prof. Dr. Nilson Nicolau Júnior

Uberlândia, Minas Gerais

Junho / 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Expressão e purificação da *Outer membrane protein A (OmpA)* de *Rickettsia rickettsii*  
expressa em sistema bacteriano**

Isadora de Cássia Garrafa

Aprovado pela Banca Examinadora em: 22/06/2023.

---

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

---

Prof. Dr. Victor Alexandre Félix Bastos

---

Me. Luiz Felipe Fernandes Peixoto

Uberlândia, 22 de junho de 2023

Às memórias de Luis Alessandro e Thiago, jovens aventureiros que me ensinaram caminhar pelo mundo.

À Breno, Bruno, Eloá, Henry e Larissa, que um dia irão procurar as próprias formações.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por ter me conduzido com saúde e determinação durante os meus anos de estudos.

Aos meus pais e avós, que me incentivaram nos momentos difíceis e não me deixaram desanimar durante a realização deste trabalho. Agradeço também por todo o aporte que me dão para desempenhar meu processo de formação profissional.

À minha bisavó e às minhas avós, que alicerçam meus passos com suas bençãos e orações.

À minha família e amigos, pelos momentos de companheirismo e pela compreensão aos momentos de ausência.

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Jonny Yokosawa pela oportunidade e por me orientar perante os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho, sempre disponível a compartilhar o seu conhecimento.

À doutoranda Mayara Polli pelos ensinamentos, orientações e parceria.

A Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e todo seu corpo docente, direção e administração pelo ambiente amigável e criativo, por confiança no mérito e ética aqui presentes e ensinados.

A todos aqueles que desempenharam um papel significativo no meu crescimento, que nunca me recusaram incentivo, amor e afeto, e devem ser recompensados com minha eterna gratidão.

Sou grata a todos que de forma, direta ou indireta, participaram da realização deste trabalho de pesquisa e enriqueceram meu aprendizado, e a àqueles com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que, certamente, tiveram impacto na minha formação acadêmica.

“Nunca estou realmente satisfeita quanto a entender alguma coisa; porque, até onde entendo, a minha compreensão só pode ser uma fração infinitesimal de tudo o que eu quero compreender.”

(Ada Lovelace)

## RESUMO

A infecção causada por *Rickettsia rickettsii* é a principal zoonose transmitida por carrapatos e apresenta elevada taxa de letalidade em humanos no Brasil. Atualmente, o ensaio padrão-ouro para o diagnóstico da infecção tanto por *R. rickettsii* como por outras espécies de *Rickettsia*, em especial daquelas que fazem parte do grupo da febre maculosa, é a imunofluorescência indireta, que apresenta algumas desvantagens, como a subjetividade e a forma de obtenção do antígeno, que é feita por meio do cultivo de cepas de diferentes espécies de *Rickettsia* em células de mamífero. Em estudo prévio, a *Outer membrane protein A* (OmpA) truncada de *R. rickettsii* cepa *Brazil* foi expressa em *Escherichia coli* como proteína de fusão com proteína de ligação a maltose (MBP-OmpA) e utilizada em *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para o teste de amostras de soro de capivaras, gambás e cavalos. No entanto, o teste apresentou boa reatividade somente com os soros de gambás, possivelmente pelo fato de a MBP-OmpA não ter sido submetida a um processo de purificação. Assim, o principal objetivo do presente projeto foi realizar os processos de expressão e purificação da MBP-OmpA por meio da cauda de 6xHis fusionada a proteína. Como a proteína formou agregados durante a lise das células bacterianas, o precipitado foi solubilizado com tampão contendo ureia 8 M e a purificação foi realizada em condições desnaturantes. Com a utilização da Ni-NTA *spin column*, não foi observada a MBP-OmpA em eletroforese. No entanto, com a Ni-NTA agarose, foi observada uma banda proteica, porém com massa molecular aparentemente um pouco maior que a esperada. As frações obtidas durante a purificação foram testadas em ELISA, utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis, e os poços com reatividade maior correspondem com as frações nas quais as bandas proteicas apresentaram intensidade maior na eletroforese, indicando que provavelmente essas bandas representam a MBP-OmpA. *Pools* serão realizados com essas frações e o preparado será avaliado, em etapas futuras, em ELISA utilizando soros de capivaras, gambás e cavalos.

**Palavras-chave:** Ni-NTA agarose; MBP-OmpA; ELISA.



## ABSTRACT

The infection caused by *Rickettsia rickettsii* is the main zoonosis transmitted by ticks and has a high mortality rate in humans in Brazil. Currently, the gold standard assay for diagnosing infection with both *R. rickettsii* and other *Rickettsia* species, especially those that are part of the Rocky Mountain spotted fever group, is indirect immunofluorescence, which has some disadvantages such as subjectivity and the way of obtaining the antigen, which is done by growing strains of different species of *Rickettsia* in mammalian cells. In a previous study, truncated Outer membrane protein A (OmpA) from *R. rickettsii* strain Brazil was expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein with maltose-binding protein (MBP-OmpA) and used in *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) for testing serum samples from capybaras, opossums, and horses. However, the test showed good reactivity only with sera from opossums, possibly because MBP-OmpA was not subjected to a purification process. Thus, the main objective of this project was to carry out the processes of expression and purification of MBP-OmpA through the 6xHis tail fused to protein. Since the protein formed aggregates during bacterial cell lysis, the precipitate was solubilized with buffer containing 8 M urea and purification was performed under denaturing conditions. With the use of the Ni-NTA spin column, the MBP-OmpA was not observed in electrophoresis. However, with Ni-NTA agarose, a protein band was observed, but with a molecular mass apparently a little higher than expected. Fractions obtained during purification were tested in ELISA, using anti-6xHis monoclonal antibody, and the wells with greater reactivity correspond to the fractions in which the protein bands were more intense on electrophoresis, indicating that these bands probably represent MBP-OmpA. *Pools* will be carried out with these fractions and the preparation will be evaluated, in future stages, in ELISA using sera from capybaras, opossums and horses.

**Keywords:** Ni-NTA agarose; MBP-OmpA; ELISA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Formas evolutivas de <i>Amblyomma sculptum</i> , principal vetor do Brasil ....	17
<b>Figura 2:</b> Esquema das interações das rickettsias com sistema imunológico do hospedeiro.....	18
<b>Figura 3:</b> Cachorro infestado de carrapatos <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	19
<b>Figura 4:</b> Erupções cutâneas associadas à Febre Maculosa .....	21
<b>Figura 5:</b> Imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG contra <i>Rickettsia</i> do grupo febre maculosa.....	22
<b>Figura 6:</b> Esquema do mapa físico simplificado de pMAL-c4X-RRBROATR.....	24
<b>Figura 7:</b> SDS-PAGE para avaliação da solubilidade da MBP-OmpA e MBP.....	27
<b>Figura 8:</b> SDS-PAGE para avaliação dos sobrenadantes da MBP e MBP-OmpA e solubilizações da S1. ....	28
<b>Figura 9:</b> (A) SDS-PAGE para avaliação da purificação da S1 por Ni-NTA spin column; (B) gel corado com Pierce Color Silver Stain Kit. ....	29
<b>Figura 10:</b> SDS-PAGE para avaliação da purificação da S1 por Ni-NTA agarose.....	30
<b>Figura 11:</b> ELISA das frações obtidas com a purificação da MBP-OmpA utilizando Ni-NTA agarose.....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento/porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (inglês)/soroalbumina bovina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FM	Febre Maculosa
GC	Grupo Canadensis/ <i>Canadensis group</i>
GB	Grupo Belli/ <i>Belli group</i>
GFM	Grupo da Febre Maculosa/ <i>Spotted Fever group</i>
GT	Grupo Tifo/ <i>Thyphus group</i>
GTR	Grupo de transição/ <i>Transitional group</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
IFA	Imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	Illinois, Estados Unidos
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
kDa	quilodalton
M	Molar
m/v	massa fracionada por volume
mAb	anticorpo monoclonal
Mb	Megabase
MBP	proteína de ligação a maltose
MG	Minas Gerais
min	minutos

mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MW	peso molecular/ <i>molecular weight</i>
NaCl	cloreto de sódio
NK	células <i>natural killer</i>
nm	nanômetro
O/N	<i>Overnight</i>
OmpA	<i>Outer membrane protein A</i>
OmpB	<i>Outer membrane protein B</i>
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	solução salina tamponada com fosfato / Tween
PCR	reação em cadeia da polimerase / <i>polymerase chain reaction</i>
PGE2	Prostaglandina E2
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PR	Paraná
PSA	persulfato de amônio / <i>Ammonium persulfate</i> (inglês)
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
TA	Temperatura ambiente
TEMED	tetrametiletilenediamino
TMB	3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina
Tris-HCl	solução de Tris adicionada de HCl
U	Unidade
V	Volt
v/v	Volume fracionado por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1	Classificação taxonômica e biológica de <i>Rickettsia</i> spp.....	16
2.2	Vetores e modo de transmissão de <i>Rickettsia</i> sp. ....	16
2.3	Epidemiologia de <i>Rickettsia</i> sp. ....	18
2.4	Imunopatogenia e aspectos clínicos da febre maculosa.....	20
2.5	Diagnóstico das riquetsioses.....	21
2.6	Proteína OmpA no imunodiagnóstico das riquetsioses .....	23
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
3.1	Clone pMAL-c4X-RRBROATR .....	23
3.2	Expressão da MBP-OmpA.....	24
3.3	Purificação sob condições desnaturantes .....	25
3.4	Eletroforese em dodecil sulfato de sódio – gel de poliacrilamida 10% e 12% (SDS-PAGE 10% e 12%).....	26
3.5	Teste para detecção da sequência 6xHis utilizando ELISA.....	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
5.1 –	Expressão MBP-OmpA.....	27
5.1.1 –	Solubilizações dos sobrenadantes SDS-PAGE 10% .....	27
5.1.2-	Sobrenadantes MBP-OmpA e solubilização 1 da MBP-OmpA.....	28
5.2 –	Purificação MBP-OmpA e teste ELISA.....	29
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1906, o infectologista Howard Ricketts descobriu a primeira bactéria do gênero *Rickettsia* no Vale Bitterroot em Montana (EUA), ao isolar os organismos do sangue de pacientes por inoculação em cobaias que desenvolveram uma doença febril acompanhada de distinto inchaço escrotal e necrose hemorrágica (FANG; BLANTON; WALKER, 2017). As espécies de *Rickettsia* evoluíram com adaptabilidade para condições ambientais diversas, incluindo variados graus de mutualismo e patogenicidade com vetores artrópodes e hospedeiros mamíferos. Os carrapatos, vetores artrópodes, são ectoparasitas hematófagos com capacidade de transmitir múltiplos patógenos a humanos e preocupantes à saúde pública. As recentes mudanças climáticas contribuíram para a expansão de ectoparasitas em novas áreas geográficas, formando epicentros das doenças transmitidas por esses vetores (KIM, 2022).

A *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico da riquetsiose mais grave, a febre maculosa (FM), apresentando taxas de letalidade de 23% para indivíduos não tratados e 4% para tratados. A doença é caracterizada por febre acompanhada de dor de cabeça e mialgias; sintomas gastrointestinais como náusea, vômito e dor abdominal; erupções cutâneas, que surgem 3 a 5 dias após o início da infecção; máculas nos pulsos e tornozelos, que se espalham em direção ao tronco e envolvem mãos e solas dos pés; e em casos mais graves, pode ocorrer necrose cutânea e gangrena (GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; MCFEE, 2018; BLANTON, 2019; SAHNI *et al.*, 2019). A FM é caracterizada por um curso clínico variável, com manifestações de sintomas inespecíficos e de início geralmente abrupto. Em decorrência da inespecificidade, o diagnóstico precoce é dificultado, sendo confundido com outras doenças febris agudas, como a dengue, hepatite viral, salmonelose, leptospirose, encefalite e malária (ZANCHETTA E GAVA *et al.*, 2022).

No continente americano, a *Rickettsia parkeri*, causadora de riquetsiose com sintomas brandos, também apresenta ampla distribuição, sendo descrito a presença desta bactéria em carrapatos na América Central, costa da Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Chile, parte do Brasil e Argentina, e a maior parte da Bolívia, Paraguai e Uruguai (LABRUNA, 2009; SAHNI *et al.*, 2019; MOO-LLANES *et al.*, 2021). A *R. parkeri* foi inicialmente isolada em 1939 de carrapatos *Amblyomma maculatum* coletados de gado no Texas e caracterizada como uma doença de febre branda com edema. Após 60 anos de especulação, a patogenicidade da *R. parkeri* foi confirmada através de um paciente na Virgínia (EUA) que apresentou sintomas febris leves acompanhado de múltiplas escaras e erupção maculopapular (PADDOCK *et al.*, 2004). Semelhante a outras infecções por riquetsias transmitidas por carrapatos, os pacientes

infectados por *R. parkeri* exibem uma combinação de sintomas clínicos inespecíficos (por exemplo, febre, dor de cabeça, mal-estar e mialgia) e escaras características no local de inoculação da fixação do carrapato. Nenhum caso fatal foi relatado por infecções por *R. parkeri* (MOO-LLANES *et al.*, 2021; KIM, 2022).

No Brasil a FM apresenta maior concentração nas regiões Sudeste e Sul, sendo a *R. rickettsii* o principal agente etiológico de casos graves, acometendo animais vertebrados, incluindo humanos, e acarretando problemas sérios de saúde pública com elevados índices de morbidade e mortalidade, devido ao potencial zoonótico e gravidade variável (ZANCHETTA E GAVA *et al.*, 2022). Em Belo Horizonte, MG, casos clínicos humanos de FM por *R. rickettsii* cepa Pampulha, foram registrados na região da Lagoa da Pampulha (POLO *et al.*, 2017). Na reserva de Mata Atlântica no município de Peruíbe, SP, sudeste do Brasil, foi relatada a presença de *R. parkeri*, cepa da Mata Atlântica, em adultos de *Amblyomma ovale* coletados em cães (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Em Uberlândia, MG, estudos soropidemiológicos demonstraram soro reatividade para *Rickettsia* em pequenos mamíferos, na região periurbana do município (COELHO *et al.*, 2016).

O teste padrão-ouro para o diagnóstico de riquetsiose é realizado por meio de ensaio de imunofluorescência indireta (IFA –*immunofluorescence assay*), realizado utilizando um conjugado marcado com fluoresceína para detectar os anticorpos séricos IgM e IgG, em reação com antígenos de *Rickettsia* fixados em uma lâmina (BIGGS *et al.*, 2016). No entanto, a realização do teste requer um técnico capacitado, para observação da lâmina em microscópio de fluorescência e sua decisão sobre a reatividade da amostra testada, tornando o IFA um teste subjetivo. Dessa forma, a obtenção de um teste ELISA terá vantagens tanto para a identificação de casos da riquetsiose em humanos e animais como para realizar um monitoramento sorológico da circulação dessas espécies em uma determinada região.

Para alcançar o desenvolvimento de um teste sorológico por ELISA, o presente projeto teve como objetivos a expressão e a purificação da *Outer membrane protein A (OmpA)*, uma proteína presente em espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa. Para isso, a OmpA truncada foi desenhada para ser expressa como proteína de fusão com a *maltose-binding protein (MBP)* e conter a sequência de 6xHis, para purificação com resinas de afinidade compatíveis. A MBP-OmpA obtida será avaliada, em etapas futuras, em ELISA como teste sorológico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Classificação taxonômica e biológica de *Rickettsia* spp.

Os bacilos gram-negativos do gênero *Rickettsia* (0,3 a 0,5 µm por 0,8 a 2,0 µm) são organismos intracelulares obrigatórios que possuem membranas internas e externas e encontram-se livres no citoplasma das células infectadas, separados por uma camada periplasmática, onde se replicam por divisão binária (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; BLANTON, 2019). Por possuírem genomas pequenos (1,1-1,5 Mb) e pela evolução reductiva, são organismos que obtêm algumas moléculas biossintéticas por meio da célula hospedeira, (FANG; BLANTON; WALKER, 2017). As espécies pertencentes ao gênero *Rickettsia* são classificadas em cinco diferentes grupos : Grupo do Tifo (*Thyphus Group* - GT), Grupo de Transição (*Transitional Group* - GTR), Grupo Canadensis (*Canadensis group* - GC), Grupo Belli (*Belli Group* - GB) e Grupo da Febre Maculosa (*Spotted Fever Group* - GFM), sendo este último composto por mais de 22 espécies, filogeneticamente relacionadas aos ancestrais comuns do gênero, a *Rickettsia bellii* e a *R. canadensis*, e representado pela *R. rickettsii* (WEINERT *et al.* 2009).

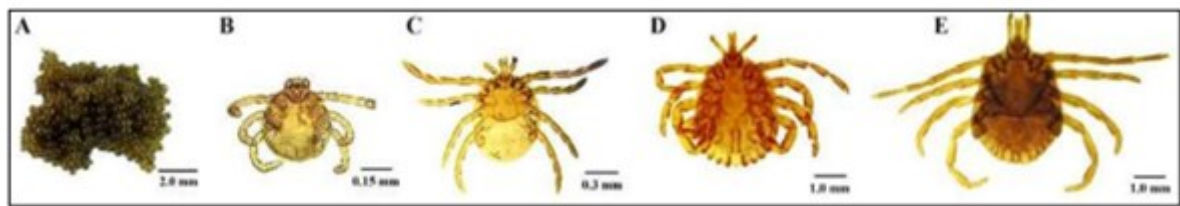
### 2.2 Vetores e modo de transmissão de *Rickettsia* sp.

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à subclasse *Acari*, superordem *Parasitiforme*, ordem *Ixodida*, são encontrados em quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, ninfa e adultos e parasitam mamíferos terrestres, anfíbios, répteis e aves. A família *Ixodidae* compreende 14 gêneros e 736 espécies, com registro de 5 gêneros no Brasil: *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* e 47 espécies. Os carrapatos da família *Ixodidae* são ectoparasitas hematófagos distribuídos mundialmente e envolvidos na transmissão de diversos patógenos, incluindo bactérias, protozoários e vírus, que causam uma ampla gama de doenças humanas e animais, sendo alguns exemplos: Anaplasmose (*Anaplasma phagocytophilum*), doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), Erliquiose (*Ehrlichia canis*), Febre maculosa (*R. rickettsii* e *R. parkeri*), Febre hemorrágica da Crimeia-Congo (*Nairovirus*), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (BIGGS *et al.*, 2016; MOO-LLANES *et al.*, 2021; NETO *et al.*, 2021).

A proporção de carrapatos vetores de *Rickettsia rickettsii* altamente patogênica varia em uma fração de 1 para 2000 em *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Amblyomma sculptum* (Fig. 1) e *Amblyomma aureolatum*, em contrapartida, a 50% ou mais de outros vetores



de espécies de *Rickettsia* levemente patogênica (FANG; BLANTON; WALKER, 2017). Estudos mostram que o *A. aureolatum* é mais susceptível à infecção por *R. rickettsii* do que *A. sculptum* (PAVANELO *et al.*, 2020; MOO-LLANES *et al.*, 2021). Dessa maneira os carrapatos *A. sculptum* e *A. aureolatum* são os principais vetores de *R. rickettsii*, sendo o primeiro distribuído amplamente no território brasileiro, enquanto o outro é encontrado predominantemente na região metropolitana do estado de São Paulo (GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018).

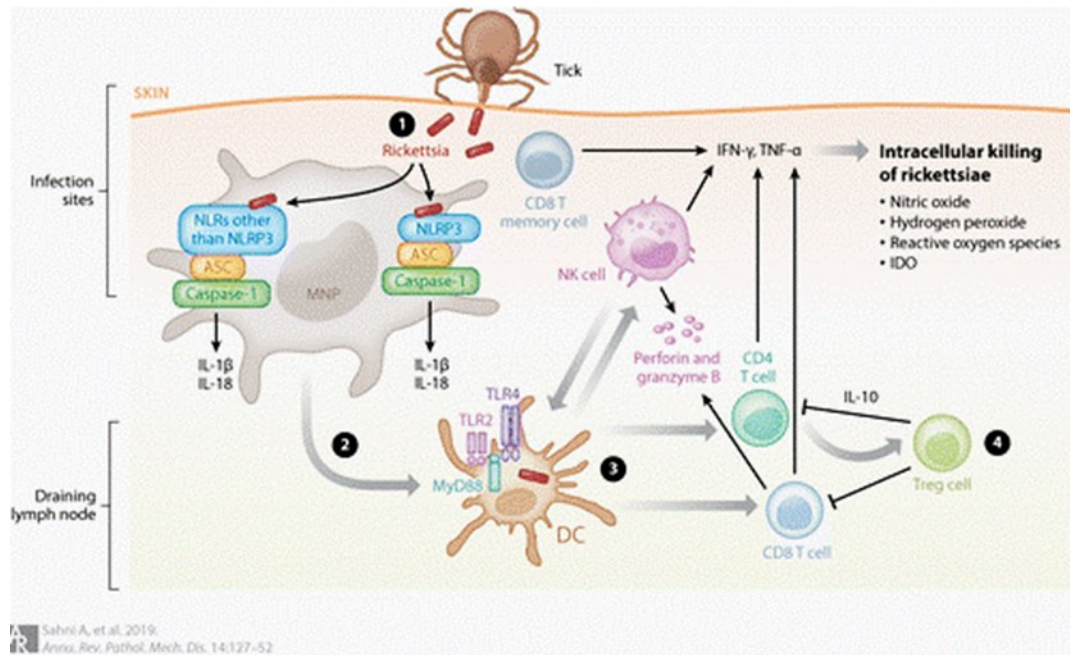


**Figura 1:** Formas evolutivas de *Amblyomma sculptum*, principal vetor do Brasil: Ovos (a); Larva (b); Ninfa (c) e Adultos: Macho (d) e fêmea (e) (NEVES *et al.* 2016).

A transmissão de *Rickettsia* spp. a vertebrados e a associação com doenças humanas é dada por vetores artrópodes, hematófagos, potencialmente por carrapatos, ácaros, pulgas e piolhos, que transmitem as bactérias do gênero através de saliva durante a alimentação ou por meio da passagem de fezes contaminadas (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; BLANTON, 2019). No caso do GFM, os carrapatos são os vetores predominantes e a transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo, processo fisiológico fundamental para as fêmeas obterem nutrientes para o desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos (BLANTON, 2019; ESTEVES *et al.*, 2019).

A sequência patogênica de eventos que ocorre na infecção (Fig.2) inicia-se com a entrada de riquetsias inoculadas pela alimentação dos carrapatos, as células-alvo iniciais da infecção são os macrófagos e as células dendríticas, em seguida, espalham-se por meio dos vasos linfáticos para a região dos gânglios e pela via hematogênica afetando, principalmente, células endoteliais microvasculares (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; SAHNI *et al.*, 2019). Estudos realizados tanto em humanos quanto em animais demonstraram que numerosos elementos do sistema imunológico têm forte impacto no controle de infecções por riquetsias, predominantemente, por mecanismos que facilitam a morte intracelular dessas bactérias. Caso o sistema imune se engaje de maneira ineficaz ou os patógenos modificarem e manipularem a

resposta desses mecanismos, a doença irá progredir com grande severidade (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; SAHNI *et al.*, 2019).



**Figura 2:** Esquema das interações das *rickettsias* com sistema imunológico do hospedeiro. Fagócito mononuclear(1); Células dendríticas (2); antígeno é apresentado pelas CD ativa subsequentemente as células NK, células T CD4 e células T CD8 (3); resposta imunossupressoras da célula T (4) (SAHNI *et al.*, 2019).

### 2.3 Epidemiologia de *Rickettsia* sp.

Desde a descoberta de Howard Ricketts, 27 espécies de riquetsias emergiram, das quais ao menos 17 são patogênicas para humanos, sendo a febre maculosa das Montanhas Rochosas (RMSF), nos EUA, causada pela *R. rickettsii* a mais severa entre elas, com 4% de taxa de letalidade em casos tratados e 23% em casos não tratados. Nas Américas Central e do Sul, a febre maculosa é transmitida por *Amblyomma* spp. e *Rhipicephalus sanguineus*. A distribuição e ocorrência da FM em um determinado local depende diretamente da ecologia daquela região, necessitando compreender os vetores e seus hospedeiros, bem como a maneira como se relacionam entre si (SOUZA *et al.*, 2016; POLO *et al.*, 2017, 2018; TORRES-CASTRO *et al.*, 2020). As capivaras são relatadas como um hospedeiro amplificador competente para *R.rickettsii* e o principal hospedeiro em áreas de transmissão onde o *A.sculptum* é o vetor para humanos. Os gambás, também hospedeiros amplificadores, apresentam menor competência, enquanto os cavalos são os hospedeiros primários de todos os estágios do *A.sculptum* no Brasil, além disso, os equinos percorrem grandes distâncias e são frequentemente usados para transporte em ambientes rurais, atuando como um agente de dispersão desses carrapatos

infectados para outras áreas, causando o surgimento de um novo foco de infecção (SOUZA *et al.*, 2016).

Assim, os pomares familiares, bem como os sítios e as zonas rurais, reúnem uma fauna sinantrópica muito diversa, que é aproveitada por muitos animais hospedeiros de diferentes espécies de carrapatos, por serem fontes alimentares a exemplo de frutas, resíduos orgânicos, ração para animais de companhia, e de abrigos como troncos, cavidades, edifícios abandonados que serão colonizados temporária ou permanentemente, implicando no estabelecimento de ciclos de transmissão de patógenos transmitidos por ectoparasitas à população (TORRES-CASTRO *et al.*, 2020).

Os equinos e cães (Fig. 3) são considerados hospedeiros sentinelas, uma vez que as condições de habitat desses animais podem apresentar como fatores de risco a presença de carrapatos infectados. No entanto, apenas a presença de anticorpos é observada, uma vez que não há ocorrência de riquetsemia e, portanto, é importante que sejam submetidos a exames sorológicos para a vigilância epidemiológica local (BRITES-NETO *et al.*, 2015; POLO *et al.*, 2018; FOURNIER *et al.*, 2020).



**Figura 3:** Cachorro infestado de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (BIGGS *et al.*, 2016)

Por outro lado, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis spp.*) são considerados hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para *A. sculptum* e pequenos roedores são hospedeiros para *A. aureolatum*, ou seja, esses animais são susceptíveis à

riquetsemia e apresentam infecção por *R. rickettsii*. O período médio de infecção primária para capivaras é de 9,2 dias, e de 2 a 8 dias, para gambás, ou seja, mantêm níveis circulantes da bactéria na corrente sanguínea, o que pode resultar na infecção de carrapatos durante o repasto sanguíneo (RAMÍREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; UENO *et al.*, 2016, 2020).

No Brasil, a FM é uma doença de notificação compulsória (OLIVEIRA *et al.*, 2017), sendo os casos desta riquetsiose mais frequentes nas regiões Sul e Sudeste, abrangendo os estados de Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (FOURNIER *et al.*, 2020; DONALISIO *et al.*, 2020). Assim, a pesquisa soropidemiológica em hospedeiros vertebrados e a detecção de *Rickettsia* em vetores invertebrados podem guiar o planejamento de políticas públicas para o controle da FM (POLO *et al.*, 2018). Portanto, o monitoramento dos hospedeiros amplificadores contribui para a vigilância epidemiológica e para o diagnóstico precoce da FM, uma vez que a disseminação de *Rickettsia* está relacionada à movimentação dos hospedeiros, sendo maior em áreas antropizadas (SOUZA *et al.*, 2016; POLO *et al.*, 2017; TORRES-CASTRO *et al.*, 2020).

#### **2.4 Imunopatogenia e aspectos clínicos da febre maculosa**

Após os vetores inocularem as riquetsias durante o repasto sanguíneo e sua disseminação pela corrente sanguínea, os eventos patogênicos iniciam nas células endoteliais microvasculares com aumento da permeabilidade vascular, evoluindo para erupções cutâneas, e em casos agravantes, podendo levar à pneumonia intersticial grave, meningoencefalite e à falência múltipla de órgãos. Entre os sintomas do quadro clínico estão febres, dores de cabeça e mialgias, sintomas gastrointestinais, a exemplo de náusea, vômitos e dores abdominais, que muitas vezes podem ser confundidos com casos cirúrgicos de abdômen agudo (FANG; BLANTON; WALKER, 2017).

Em humanos, as brotoejas começam tipicamente 3 dias após o início da doença em 49% dos pacientes e 90% começam a ter erupções cutâneas em algum ponto do quadro (Fig. 4). Normalmente aparecem máculas nos punhos e tornozelos, sendo característico também nas mãos e plantas dos pés, que passam a se espalhar para o tronco, em 4% dos casos ocorre necrose cutânea e gangrena (FANG; BLANTON; WALKER, 2017).





**Figura 4:** Erupções cutâneas associadas à Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (BIGGS *et al*, 2016)

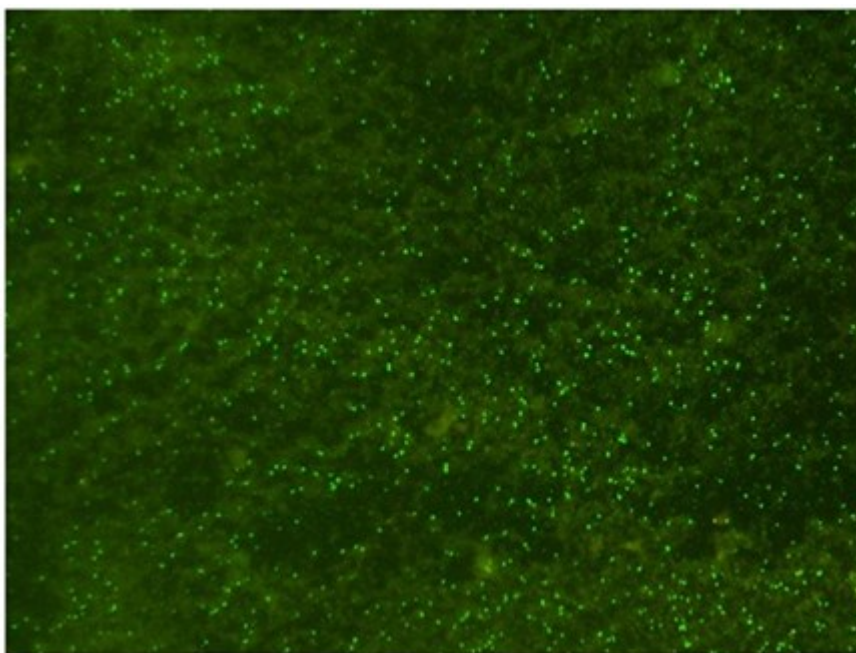
## 2.5 Diagnóstico das riquetsioses

De acordo com o diagnóstico clínico de uma infecção por *Rickettsia*, diferentes ensaios laboratoriais da FM podem ser realizados, incluindo detecção molecular, análise imunohistoquímica, sorologia, isolamento e cultura das bactérias. Dentre eles, a imunofluorescência indireta (IFA) é considerada o padrão ouro (MCFEE, 2018). Este método utiliza de um substrato com antígenos de *Rickettsia sp.* fixados em lâminas e a aplicação de um conjugado do soro do paciente marcado com fluoresceína para detectar a ligação de anticorpos séricos à placa. Uma desvantagem desse método relaciona-se à natureza subjetiva da técnica, necessitando-se de um microscopista treinado para realizar a leitura das lâminas, além da obtenção do antígeno necessitar do cultivo de cepas de *Rickettsia sp.*, em especial do GFM, em linhagem de células Vero ( FANG; BLANTON; WALKER, 2017; BLANTON, 2019).

Deve-se considerar também que os ensaios IFA são insensíveis durante a primeira semana de infecção por riquetsias, período em que a maioria dos pacientes procura atendimento médico e as amostras são coletadas. A sensibilidade aumenta à medida que a doença progride após 7 dias, em conjunto com a produção de anticorpos específicos do patógeno (WALKER *et al.*, 1995). Portanto, os resultados do ensaio são mais sensíveis na detecção de anticorpos 2 a 3 semanas após o início da doença, e mais bem interpretados quando as amostras de soro

coletadas nas fases aguda, e convalescente da doença, forem testadas em conjunto (CLEMENTS *et al.*, 1983).

A detecção de anticorpos no soro ou plasma de pacientes infectados ainda pode realizada por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e *Western blotting*. No início da infecção por *Rickettsia*, não há título de anticorpos detectável no organismo do hospedeiro vertebrado. Porém, com a progressão da infecção, geralmente após 7 a 10 dias, a resposta imune humoral promove a produção de anticorpos, as imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) (Fig.5), que ocorre quase simultaneamente, apresentando maiores níveis de anticorpos de ambos os isótopos durante a segunda semana de infecção. Uma limitação do diagnóstico por sorologia se relaciona a reação cruzada que ocorre entre os anticorpos e as diferentes espécies de *Rickettsia* do GFM (PARIS; DUMLER, 2016; GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018; BLANTON, 2019).



**Figura 5:** Imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG contra *Rickettsia* do grupo febre maculosa. Ensaio positivo com soro do paciente na diluição 1:256 (RODINO *et al.*, 2020).

A partir de amostras de biópsia de lesões cutâneas em estágio agudo é possível realizar análise histoquímica previamente ao tratamento antimicrobiano empírico (FANG; BLANTON; WALKER, 2017; FISCHER, 2018). Para se detectar sequências de DNA de *Rickettsia* spp., é utilizada, atualmente, a reação em cadeia de polimerase (PCR), sendo um teste com maior sensibilidade e especificidade, rápido e confiável quando utilizado em fase aguda das infecções e com amostras de tecido em comparação com a análise com sangue total (BLANTON, 2019; GOTTLIEB; LONG; KOYFMAN, 2018). Os ensaios de PCR são utilizados na distinção de infecções causadas por espécies de *Rickettsia* do GFM das ocasionadas por *Rickettsia* do Grupo

Tifo, visto que apenas as espécies do GFM apresentam a sequência do gene que codifica a OmpA completa. Na PCR, são utilizados *primers* para detecção de sequências de diferentes genes, como os genes que codificam para as proteínas OmpA e OmpB. Dependendo dos genes-alvo, as ferramentas de diagnóstico molecular podem identificar os patógenos em níveis de gênero ou mesmo de espécie (BLANTON, 2019).

## 2.6 Proteína OmpA no imunodiagnóstico das riquetsioses

As espécies de *Rickettsia* do GFM apresentam a proteína OmpA, fundamental para a patogênese (NORIEA; CLARK; HACKSTADT, 2015; NORIEA *et al.*, 2017;). O uso de peptídeos sintéticos de segmentos da proteína OmpA como antígenos em teste ELISA pode contribuir para o desenvolvimento de um método de diagnóstico objetivo, rápido, sensível, de baixo custo para a detecção de doenças causadas por espécies de *Rickettsia* do GFM (MUNIZ *et al.*, 2023). Estudos sugerem que antígenos recombinantes de regiões específicas de OmpA podem ser ferramentas promissoras no desenvolvimento de ensaios de imunodiagnóstico para riquetsioses, a fim de minimizar a ocorrência de reações cruzadas provocadas por anticorpos produzidos nas infecções causadas por espécies de *Rickettsia* que não são do GFM e, por isso, de menor importância à saúde pública (DO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, peptídeos com sequências de aminoácidos que diferem entre *R. rickettsii* e *R. parkeri* podem auxiliar na identificação da espécie causadora da doença e contribuir na redução da ocorrência de reações cruzadas, já que é comum a ocorrência de equívoco no diagnóstico de infecções causadas pelas duas espécies por meio de testes sorológicos (LABRUNA, 2009; FANG; BLANTON; WALKER, 2017; BLANTON, 2019).

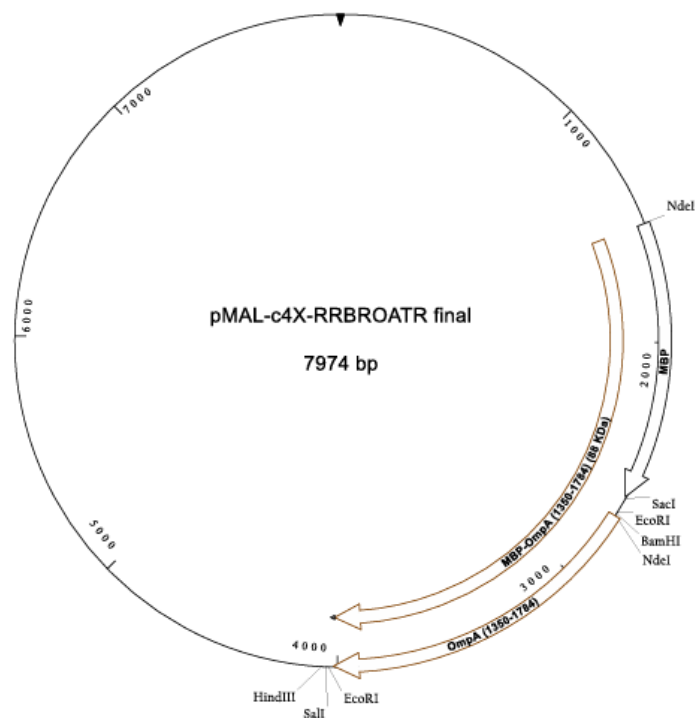
As proteínas recombinantes podem ser obtidas em diferentes hospedeiros como, bactérias, leveduras, e células de mamíferos, sendo a bactéria *Escherichia coli* o meio de expressão de proteínas heterólogas mais utilizado, é um organismo amplamente conhecido geneticamente, de cultivo rápido e produz altas quantidades de proteínas recombinantes a baixo custo (MAKRIDES, 1996).

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Clone pMAL-c4X-RRBROATR

O clone utilizado neste trabalho foi construído na tese de mestrado realizada pela Me. Ana Paula Muniz, em que foram utilizados o vetor pMAL-c4X e a sequência nucleotídica

codificante do segmento 1350-1784 de OmpA de *R.rickettsii* cepa Brazil (*Biomatik*), para a expressão de uma proteína fundida com MBP, uma proteína acessória de ligação a maltose e OmpA truncada (Fig.6). Para auxiliar na purificação da proteína expressa e identificação pelo anticorpo monoclonal anti-6xHis, na extremidade 3', foi adicionada a sequência codificante 6xHis (MUNIZ, 2021). MUNIZ também realizou a obtenção de um clone para expressão da MBP, para controle e codificada no vetor pMAL-c4X, em que uma alíquota de DNA de pMAL-c4X-RRBROATR foi digerido com Eco RI para remover o segmento que codifica para a OmpA.



**Figura 6:** Esquema do mapa físico simplificado de pMAL-c4X-RRBROATR. As sequências codificantes da proteína de ligação a maltose (MBP) e do segmento 1350–1784 de OmpA (RRBROATR) estão indicados. Na extremidade final da RRBROATR também há a sequência 6xHis.

### 3.2 Expressão da MBP-OmpA

O clone 50, transformado com pMAL-c4X-RRBROATR (Fig. 6), e o clone 65, transformado com o vetor pMAL-c4X modificado, foram os escolhidos para realizar a expressão.

O primeiro cultivo foi realizado com inoculação em 30 mL de meio 2xYT (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%) para o clone 50 (para MBP-OmpA) e em 10 mL de meio 2xYT para o clone 65 (para MBP), ambos contendo ampicilina 100 µg/mL e incubados



em *shaker* à 37 °C *overnight*. No segundo cultivo, foram adicionados 300 mL e 100 mL de meio 2xYT, respectivamente, e incubados em *shaker* à 37 °C por 3 horas. Na sequência, foi adicionado isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) para a concentração final de 1,0 mM a cada cultivo, a fim de induzir a expressão de proteínas, e então incubado novamente por 3 horas à 37 °C em *shaker*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 xg, por 30 minutos, a 4 °C e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 1600 µL de tampão de lise (Tris-HCl 65 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M) para MBP-OmpA e 1100 µL para MBP.

Na suspensão, foram adicionados 15 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM e 30 µL de lisozima 10 mg/mL para MBP-OmpA e 10 µL de PMSF e 20 µL de lisozima 10 mg/mL para MBP, com incubação por 10 min a 4 °C. Na sequência, foram realizados quatro ciclos de congelamento para digestão e fragmentação enzimática das proteínas, em nitrogênio líquido, seguido de descongelamento à temperatura ambiente. Após os ciclos de congelamento e descongelamento, foram adicionados 15 µL de DNase I 2 U/µL e 5 µL de MgCl<sub>2</sub> 100 mM ao lisado contendo MBP-OmpA e 10 µL de DNase I 2 U/µL e 3,3 µL de MgCl<sub>2</sub> 100 mM ao lisado contendo MBP, com posterior incubação em temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Os lisados foram centrifugados a 15000 xg à 4 °C por 10 min e tanto o sobrenadante como o precipitado foram armazenados à -20 °C. Os *pellets* foram então tratados com 500 µL de tampão Tris-HCl / ureia 8 M ((Tris-HCl 65 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, ureia 8M) e os microtubos foram centrifugados a 1500 xg à 4 °C por 20 min, com cinco a oito repetições para MBP-OmpA (S1 a S8) e três para MBP (S1 a S3). Os sobrenadantes da solubilização foram armazenados à -20 °C. Posteriormente, as solubilizações foram submetidas à SDS-PAGE para análise da expressão.

### 3.3 Purificação sob condições desnaturantes

A purificação foi realizada com resina Ni-NTA agarose de acordo as instruções do fabricante (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Foram adicionados 100 µL da suspensão Ni-NTA agarose 50% a 400 µL da S1 da MBP-OmpA com tampão B (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 8,0) e o tubo foi agitado em *shaker* a 200 rpm por 60 min à TA. A mistura foi centrifugada a 270 xg à 20 °C por 5 min e, após, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. A resina foi lavada duas vezes com 300 µL de tampão C (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 6,3) e para etapa de eluição foram realizadas quatro repetições com tampão D (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 5,9) e seis repetições com tampão E (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 4,5), com 125 µL de tampão

em ambas as etapas; as frações foram centrifugadas a 890 xg por 2 min à 20°C. As frações proteicas foram submetidas a análise por SDS-PAGE e teste ELISA utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis (ThermoFisher) para detecção da cauda de 6xHis presente.

### **3.4 Eletroforese em dodecil sulfato de sódio – gel de poliacrilamida 10% e 12% (SDS-PAGE 10% e 12%)**

As avaliações dos processos expressão e purificação de MBP-OmpA foram realizadas por meio de SDS-PAGE. A eletroforese foi conduzida em sistema completo vertical com tampão de corrida Tris-glicina-SDS, nas condições de 125 V. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 0,2% (m/v) em 50% metanol/10% ácido acético (v/v) e, para as amostras obtidas da purificação, o gel foi corado com *Pierce Color Silver Stain Kit* (*Pierce Biotechnology/Thermo Scientific*, Rockford, IL, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para monitorar o progresso da eletroforese em gel SDS-poliacrilamida e para estimar o tamanho aproximado de proteínas separadas que se tornaram visíveis foi utilizado um marcador de proteína MW pré-corado da *Thermo Scientific*.

### **3.5 Teste para detecção da sequência 6xHis utilizando ELISA**

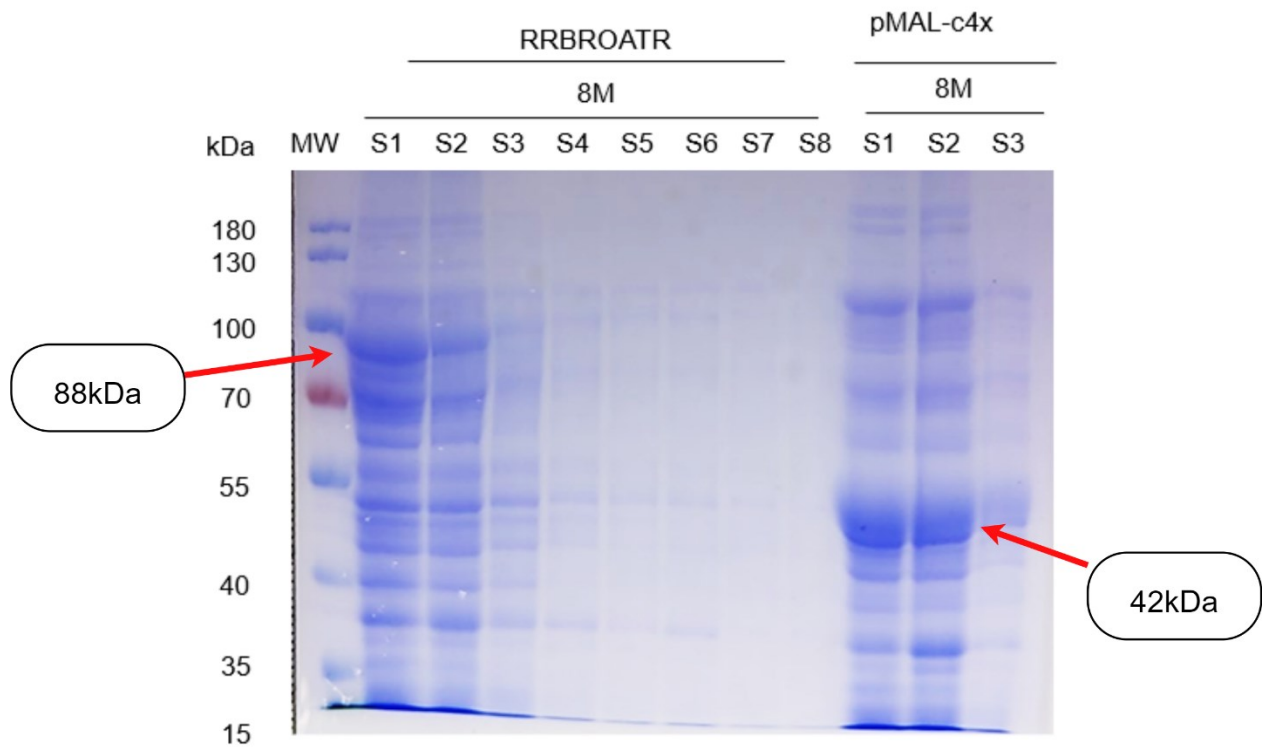
O teste realizado para detecção da sequência 6xHis presente na MBP-OmpA foi o ELISA, utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis em uma placa Costar de 96 poços (Corning Inc. Corning, NY, EUA). Para sensibilização dos poços foram utilizados 5 µL das frações solubilizadas e 45 µL de PBS 1x, a placa foi incubada por 1 h à 37 °C. A seguir, foi realizada a lavagem dos poços com PBS 1x contendo 0,05% Tween 20 (PBS1X-T) e feito o bloqueio com 100 µL/poço de PBS 1x contendo BSA 1,5% por 1 h à 37 °C. Posteriormente, os poços foram lavados uma vez com PBS1X-T e incubados com 50 µL/poço de anticorpo monoclonal (mAb) anti-6xHis (ThermoFisher) 250 ng/mL diluído em PBS1X+BSA 1,5% por 1 h à 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com PBS1X-T e 50 µL de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase 0,2 µg/mL (KPL, Gaithersburg, MD, EUA) em PBS1X+BSA 1,5% foram adicionados, seguidos de incubação por 30 min à 37 °C. Os poços foram novamente lavados cinco vezes com PBS1x-T e incubados com 50 µL de 3, 3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fisher Scientific) por 15 min à TA. Para interromper a reação foram adicionados 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M. A densidade óptica de cada poço foi medida em uma leitora de ELISA no comprimento de onda 450 nm. Os valores de DO de todas as amostras foram subtraídos do branco (sem mAb).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 – Expressão MBP-OmpA

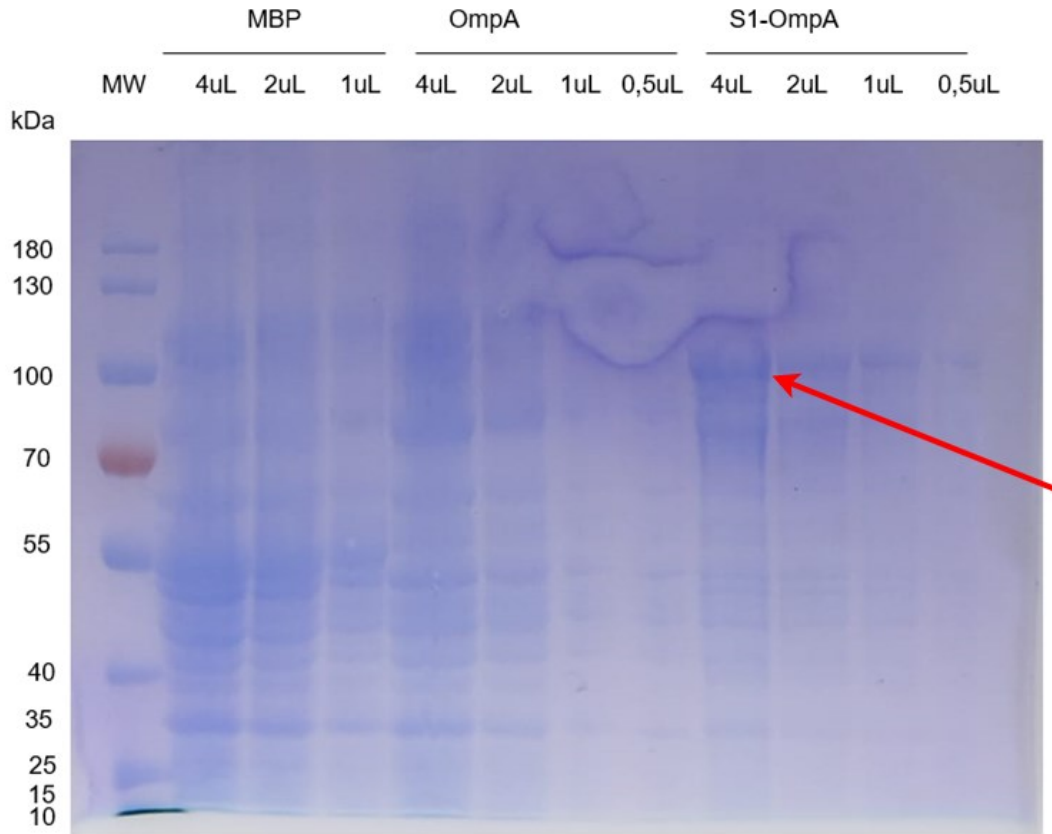
Após realizada a solubilização com tampão contendo ureia 8 M, as frações obtidas foram submetidas à SDS-PAGE 10%. Foram observadas as bandas proteicas com massas moleculares esperadas para MBP-OmpA (88kDa) e para MBP (42 kDa) (Figs. 7 e 8).

#### 5.1.1 – Solubilizações dos sobrenadantes SDS-PAGE 10%



**Figura 7:** SDS-PAGE para avaliação da solubilidade da MBP-OmpA e MBP. S1 à S8 Lisados celulares dos clones coletados da MBP-OmpA; e S1 à S3 lisados celulares dos clones coletados da MBP.

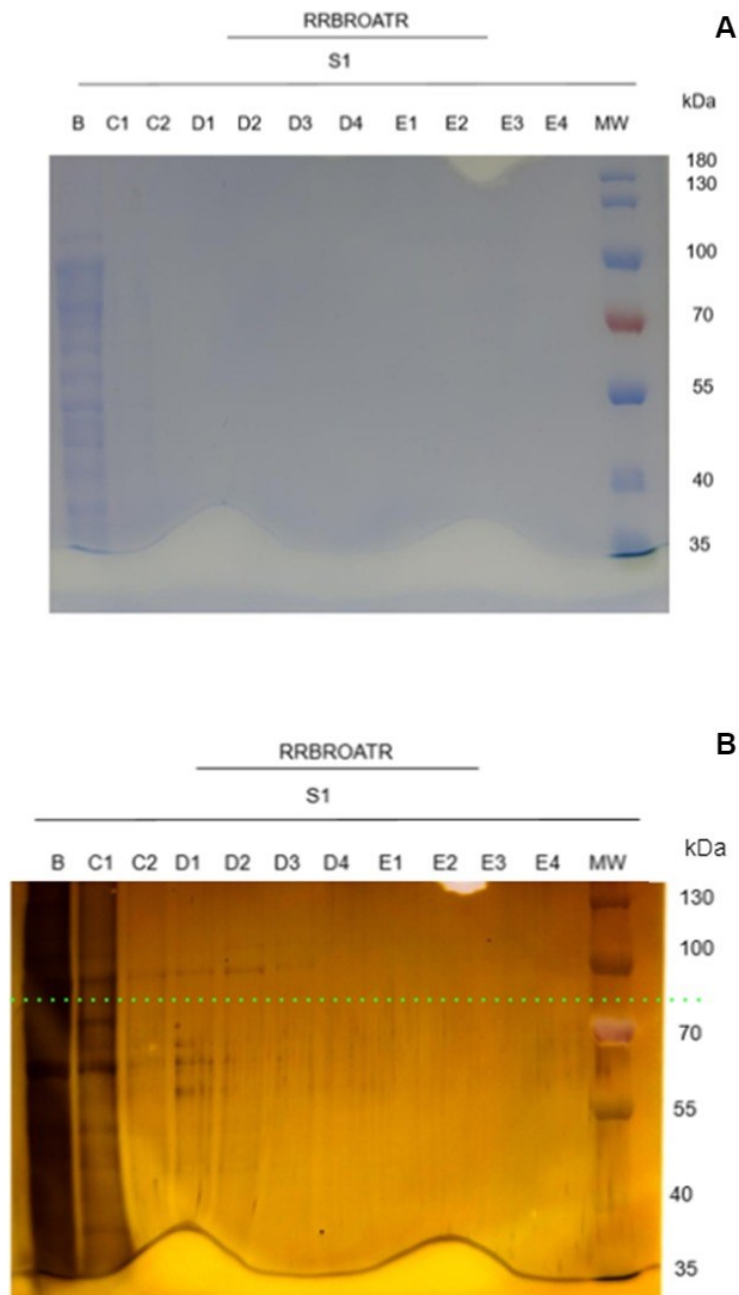
### 5.1.2- Sobrenadantes MBP-OmpA e solubilização 1 da MBP-OmpA



**Figura 8:** SDS-PAGE para avaliação dos sobrenadantes da MBP e MBP-OmpA e solubilizações da S1. A seta vermelha indica provavelmente a MBP-OmpA, de massa molecular esperada de 88 kDa.

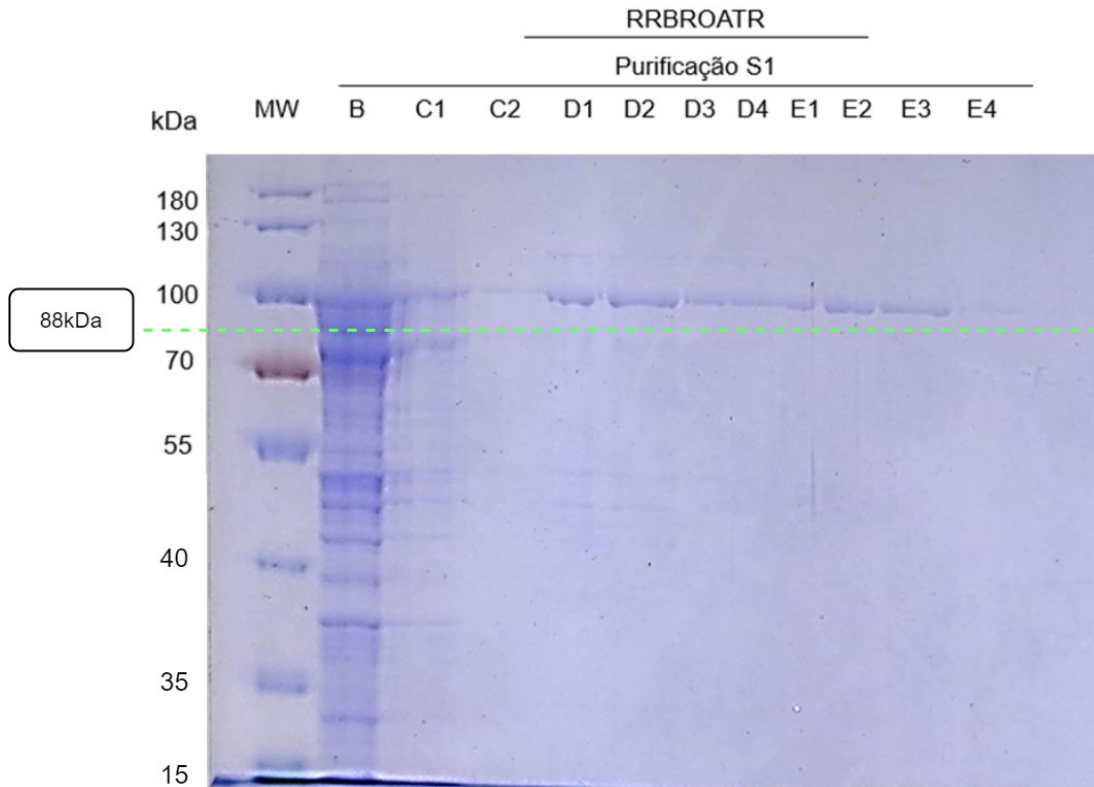
## 5.2 – Purificação MBP-OmpA e teste ELISA

A fração da solubilização S1, foi utilizada para a etapa de purificação utilizando, primeiramente, a Ni-NTA *spin column*. Porém, não foi observada a banda proteica quando utilizado o Pierce Color Silver Stain Kit (Fig. 9). Os tampões B, C, D, e E e suas respectivas lavagens e eluições estão marcados na figura, executados de acordo a metodologia descrita previamente.



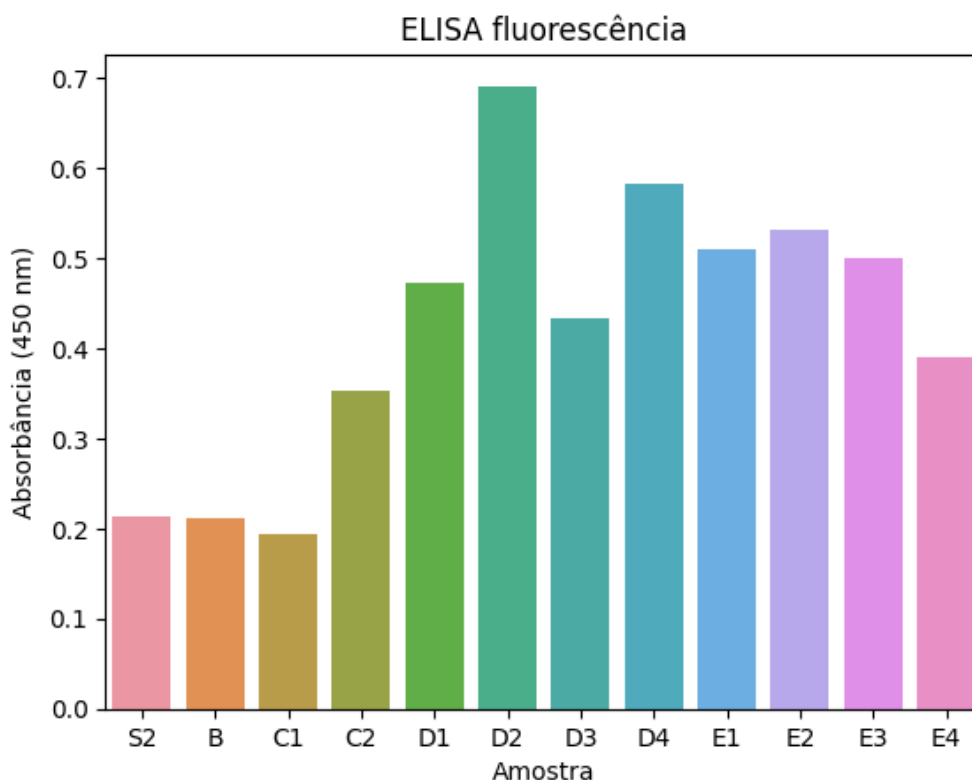
**Figura 9:** (A) SDS-PAGE para avaliação da purificação da S1 por Ni-NTA *spin column*; (B) gel corado com *Pierce Color Silver Stain Kit*. A linha verde pontilhada indica a posição da banda esperada.

Com a Ni-NTA agarose, foram observadas bandas proteicas nas frações obtidas com os tampões de eluição D e E (Fig. 10). No entanto, a massa molecular da banda parece ser maior que a esperada para a MBP-OmpA, que é de 88 kDa.



**Figura 10:** SDS-PAGE para avaliação da purificação da S1 por Ni-NTA agarose; tampões B-E para eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM, Tris HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 8,0). Linha verde indica posição da banda esperada.

Para resolver a dúvida, foi realizado o ELISA com as mesmas frações, utilizando o anticorpo monoclonal anti-6xHis (Fig. 11). No teste, a reatividade observada foi maior com as frações em que a intensidade da banda também foi maior na eletroforese, sugerindo que a aparente massa molecular maior foi devido à mobilidade alterada no gel.



**Figura 11:** ELISA das frações obtidas com a purificação da MBP-OmpA utilizando Ni-NTA agarose. S2 é a fração mostrada na Fig. 5. As letras representam os tampões usados e os números as repetições. (Autoria própria).

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo a purificação foi testada em condições desnaturantes com a utilização da Ni-NTA *spin column*, em que não foi observada a MBP-OmpA em eletroforese, no entanto, em testes de purificação com a Ni-NTA agarose, foi observada a presença de uma banda proteica, porém com massa molecular aparentemente um pouco maior que a esperada. Durante a realização da purificação com a Ni-NTA *spin column* ocorreu uma adversidade na permeabilidade da resina, tal obstáculo foi resolvido com a purificação em Ni-NTA agarose.

Considerando que não foi realizada uma dosagem de proteínas presentes nas amostras, é possível que algumas bandas não foram observadas pela baixa concentração destas. Ao realizar um teste em ELISA foi verificado que a aparente massa molecular acima do esperado sugere uma mobilidade alterada no gel, assim como há a possibilidade de uma alteração no formato do gel ao utilizar o *Pierce Color Silver Stain Kit* (ver figura 9). As demais proteínas detectadas com menor ocorrência e peso molecular inferior a 88kDa (ver figuras 7 e 8), podem representar membros da família de antígenos de superfície celular (*Sca- Surface cell antigen*),

sabendo-se que a membrana externa de uma bactéria é responsável pela ligação entre o microrganismo e o hospedeiro, desempenhando um papel essencial na adesão à célula e na evasão da resposta imune do hospedeiro (MAVROMATIS *et al.*, 2006). As proteínas bacterianas que intercedem essas interações entre as diferentes espécies de *Rickettsia* são alvos da resposta imune do hospedeiro e têm grande relevância no diagnóstico diferencial entre as espécies de riquetsias (TJALSMA; SCHAEPS; SWINKELS, 2008). Contudo, para caracterização proteica, estudos empregando a técnica de cromatografia líquida associada a espectrometria de massas deverão ser conduzidos.

As frações obtidas durante a purificação e testadas em ELISA, utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis, e os poços com reatividade maior correspondem com as frações nas quais as bandas proteicas apresentaram maior intensidade na eletroforese, indicando que, possivelmente, essas bandas representam a MBP-OmpA. Serão realizados *pools* com essas frações para avaliação.

Identificar áreas endêmicas é importante para a vigilância epidemiológica da febre maculosa em humanos, animais domésticos e silvestres, dessa forma, a obtenção de um teste sorológico rápido e eficiente a baixo custo trará vantagens para o monitoramento da circulação e expansão das riquetsioses nas regiões. Vários estudos utilizam a IFA para pesquisa soroepidemiológica em humanos, cães, gatos, capivaras, gambás, cavalos, pequenos mamíferos e outros animais silvestres (COELHO *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; UENO *et al.*, 2016, 2020; VIANNA *et al.*, 2018; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Contudo, trata-se de um imunoenensaio sensível ao período de inoculação e de manifestação dos sintomas, diferentemente, o teste ELISA, como observado por Clements *et al.* (1983) permite a detecção de anticorpos em até um ano após a doença, sendo um método adequado para estudos e sorodiagnóstico. Assim, a purificação da MBP-OmpA, e potencialmente o desenvolvimento de testes ELISA, são importantes para vigilância soroepidemiológica da febre maculosa, tendo um caráter de baixo custo.

## 7 CONCLUSÃO

Por meio do presente estudo, foi possível realizar a expressão e, potencialmente, a purificação da *Outer membrane protein A* truncada de *Rickettsia rickettsii* cepa Brasil na forma de proteína fundida com a *maltose-binding protein*. A MBP-OmpA purificada será, em etapas futuras, avaliada em ELISA com soros de capivaras, gambás e cavalos.



## REFERÊNCIAS

BIGGS, H. M.; BEHRAVESH, C. B.; BRADLEY, K. K.; DAHLGREN, F. S.; DREXLER, N. A.; DUMLER, J. S.; FOLK, S. M.; KATO, C. Y.; LASH, R. R.; LEVIN, M. L.; MASSUNG, R. F.; NADELMAN, R. B.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; PRITT, B. S.; TRAEGER, M. S. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis --- United States. **MMWR Recommendations and Reports** 2016, vol. 65, n. 2, p. 1–44, 2016.

BLANTON, L. S. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 213–229, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.010>

BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R. Epidemiological surveillance of capybaras and ticks on warning area for Brazilian spotted fever. **Veterinary World**, v. 8, n. 9, p. 1143–1149, 2015. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1143-1149>.

CLEMENTS, M. L.; DUMLER, J. S.; Fiset, P.; WISSEMAN, C. L.; SNYDER, M. J.; LEVINE, M. M. Serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever: Comparison of IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays and indirect fluorescent antibody test. *Journal of Infectious Diseases*, v. 148, n. 5, p. 876–880, 1983. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.5.876>.

COELHO, M. G.; RAMOS, V. N.; LIMONGI, J. E.; LEMOS, E. R. S.; GUTERRES, A.; COSTA NETO, S. F.; ROZENTAL, T.; BONVICINO, C. R.; D’ANDREA, P. S.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 3, p. 275–282, 2016. <https://doi.org/10.3855/jidc.7084>.

DO, E. J.; KIM, J. E.; PARK, J. M.; LEE, K. M.; JUNG, M. Y.; LEE, H. J.; CHO, H. W.; CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; JANG, W. J. Development of recombinant OmpA and OmpB proteins as diagnostic antigens for rickettsial disease. *Microbiology and Immunology*, v. 53, n. 7, p. 368–374, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00142.x>.

DONALISIO, M. R.; SOUZA, C. E.; ANGERAMI, R. N.; SAMY, A. M. Mapping Brazilian spotted fever: Linking etiological agent, vectors, and hosts. **Acta Tropica**, v. 207, n. January, p. 105496, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105496>.

ESTEVEZ, E.; BIZZARRO, B.; COSTA, F. B.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; PETI, A. P. F.; CATANEO, A. H. D.; WOWK, P. F.; TIMÓTEO, R. P.; LABRUNA, M. B.; SILVA JUNIOR, P. I.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H.; FOGAÇA, A. C.; SORGI, C. A.; SÁ-NUNES, A. *Amblyomma sculptum* salivary PGE 2 modulates the dendritic cell *Rickettsia rickettsii*

Interactions in vitro and in vivo. *Frontiers in immunology*, v. 10, n. February, p. 118, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00118>.

FANG, R.; BLANTON, L. S.; WALKER, D. H. *Rickettsiae* as emerging infectious agents. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 383–400, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.009>

FISCHER, M. Rickettsioses: Cutaneous findings frequently lead to diagnosis – a review. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, v. 16, n. 12, p. 65 1459–1476, 2018. <https://doi.org/10.1111/ddg.13712>

FOURNIER, G. F. S. R.; PINTER, A.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M. B.; LOPES, M. G.; MARTINS, T. F.; COLÁCIO, L.; MÔRA, C. R. S.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R. A. Implications of domestic dogs in the epidemiology of *Rickettsia parkeri* strain atlantic rainforest and *Rangelia vitalii* in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 1, p. 1–17, 2020. DOI <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020003>

GOTTLIEB, M.; LONG, B.; KOYFMAN, A. The evaluation and management of rocky mountain spotted fever in the emergency department: a review of the literature. *Journal of Emergency Medicine*, v. 55, n. 1, p. 42–50, 2018. DOI [10.1016/j.jemermed.2018.02.043](https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2018.02.043).

KIM, H. K. *Rickettsia* -Host-Tick Interactions: Knowledge Advances and Gaps. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 9, 15 set. 2022.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156–166, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**, v.60, p. 512-538, 1996.

MAVROMATIS, K. *et al.* The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of bacteriology*, v. 188, n. 11, p. 4015–4023, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FJJB.01837-05>

MCFEE, R. B. Tick borne illness - Rocky mountain spotted fever. **Disease-a-Month**, v. 64, n. 5, p. 185–194, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2018.01.006>

MOO-LLANES, D. A.; DE OCA-AGUILAR, A. C. M.; ROMERO-SALAS, D.; SÁNCHEZ-MONTES, S. Inferring the potential distribution of an emerging rickettsiosis in America: The case of *Rickettsia parkeri*. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 1–10, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050592>.

MUNIZ, A.P.M. **Avaliação da outer membrane protein A de *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* no desenvolvimento de Enzyme-linked immunosorbent assay para o diagnóstico de rickettsioses.** Dissertação de mestrado - Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas., Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p.81. 2021.

MUNIZ, A. P. M. et al. Evaluation of a mimotope of the *Rickettsia* outer membrane protein A (OmpA) as an antigen in enzyme-linked immunosorbent assay to detect rickettsiosis in

capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), horses (*Equus caballus*), and opossums (*Didelphis* sp.). **Experimental & applied acarology**, v. 89, n. 2, p. 317–327, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00776-5>.

NETO, D. S.; ROCHA, M. D. H. A.; CAVALCANTE, P. A. M.; MARIANO, W. S. Doenças transmitidas por vetores. São Carlos: Pedro & João Editores. 257p., 2021.

NEVES, L. C.; BARRETO, A. L. G.; DE SOUZA, M. X.; MARTINS, D. B.; BARBIERI, A. R. M.; SERPA, M. C. A.; MUÑOZ-LEAL, S.; LABRUNA, M. B.; KRAWCZAK, F. S.. Serosurvey on Rickettsiae of the spotted fever group and Rickettsia bellii among dogs in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 29, n. 2, p. 1–5, 2020. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020018>

NORIEA, N. F.; CLARK, T. R.; HACKSTADT, T. Targeted knockout of the Rickettsia rickettsii OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. *mBio*, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.00323-15>.

NORIEA, N. F.; CLARK, T. R.; MEAD, D.; HACKSTADT, T. Proteolytic cleavage of the immunodominant outer membrane protein rOmpA in Rickettsia rickettsii. *Journal of Bacteriology*, v. 199, n. 6, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1128/jb.00826-16>.

OLIVEIRA, C. S.; BRÄUNIG, P.; KRAWCZAK, F.; LABRUNA, M. B.; BOTTON, S. A.; VOGEL, F. S.F.; SANGIONI, L. A. Detecção de proteínas imunorreativas de Rickettsia sp. cepa Mata Atlântica. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 37, n. 1, p. 52–57, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000100009>

PADDOCK, C. D. *et al.* Rickettsia parkeri: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805–811, 15 mar. 2004. <https://doi.org/10.1086/381894>.

PARIS, D. H.; DUMLER, J. S.. State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: The use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 29, n. 5, p. 433–439, 2016. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000298>

PAVANELO, D. B.; SCHRÖDER, N. C.H.; PIN VISO, N. D.; MARTINS, L. A.; MALOSSI, C. D.; GALLETI, M. F.B.M.; LABRUNA, M. B.; DAFFRE, S.; FARBER, M.; FOGAÇA, A. C. Comparative analysis of the midgut microbiota of two natural tick vectors of Rickettsia rickettsii. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 106, n. January, p. 103606, 2020. DOI [10.1016/j.dci.2019.103606](https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103606).

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F. Transmission dynamics and control of Rickettsia rickettsii in populations of Hydrochoerus hydrochaeris and Amblyomma sculptum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005613>.

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F.; BROCKMANN, D. Hosts mobility and spatial spread of Rickettsia rickettsii. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 12, p. 1–18, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006636>.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; UCHOA, F.; SERPA, M. C. A.; BINDER, L. C.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* to *Amblyomma sculptum* ticks: evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 5, p. 101463, 2020. DOI [10.1016/j.ttbdis.2020.101463](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101463).

RODINO, K. G.; THEEL, E. S.; PRITT, B. S. Tick-borne diseases in the United States. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 537–548, 2020. DOI <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa040>

SAHNI, A.; FANG, R.; SAHNI, S. K.; WALKER, D. H. Pathogenesis of rickettsial diseases: pathogenic and immune mechanisms of an endotheliotropic infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. August 2018, p. 127–152, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>.

SOUZA, C. E.; CAMARGO, L. B.; PINTER, A.; DONALISIO, M. R. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 11–19, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153303>

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. July, p. 1–9, 2013. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>

TJALSMA, H.; SCHAEPS, R. M. J.; SWINKELS, D. W. Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. **Proteomics. Clinical applications**, v. 2, n. 2, p. 167–180, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/prca.200780012>

TORRES-CASTRO, M.; REYES-NOVELO, E.; NOH-PECH, H.; TELLO-MARTÍN, R.; LUGO-CABALLERO, C.; DZUL-ROSADO, K.; PUERTO-MANZANO, F.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I. Personal and household factors involved in recent *Rickettsia* exposure in a rural population from Yucatán, Mexico. **Zoonoses and Public Health**, v. 67, n. 5, p. 506–515, 2020. <https://doi.org/10.1111/zph.12714>

UENO, T. E. H.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; AGOSTINHO, W. C.; FERNANDES, W. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016. DOI [10.1186/s13071-016-1784-y](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1784-y).

UENO, T. E. H.; CUTOLO, A. A.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; DE AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in equids, opossums and ticks in the municipality of Monte Mor, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 4, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020073>.

VIANNA, M. C. B.; MAFRA, C. L.; HORTA, M. C.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M.; SANGIONI, L. A.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsiae* in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group. **The American**

Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, n. 1, p. 93–97, 2018. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.93>.

WALKER, D. H. Rocky Mountain Spotted Fever: A Seasonal Alert. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 1111–1117, 1 maio 1995.

WEINERT, L. A. *et al.* Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 1, 2 fev. 2009. DOI: [10.1186/1741-7007-7-6](https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6)

ZANCHETTA E GAVA, M.; RIBEIRO BRAGA, F.; LANGONI, H. Aspectos etiopidemiológicos da febre maculosa brasileira: revisão sistemática. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 29, p. 1–20, 2022. DOI: [10.35172/rvz.2022.v29.652](https://doi.org/10.35172/rvz.2022.v29.652). Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/652>. Acesso em: 19 jan. 2022