LUCIENE OLIVEIRA MACHADO

**Desenvolvimento de um Método de Conjugação entre o Polissacarídeo
Capsular Sorotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* e a Proteína de Superfície
Pneumocócica A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2015

LUCIENE OLIVEIRA MACHADO

**Desenvolvimento de um Método de Conjugação entre o Polissacarídeo
Capsular Sorotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* e a Proteína de Superfície
Pneumocócica A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:

Dra. Martha Massako Tanizaki

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Machado, Luciene Oliveira.

Desenvolvimento de um método de conjugação entre o polissacarídeo capsular sorotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* e a proteína de superfície pneumocócica A / Luciene Oliveira Machado. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas conjugadas.

Versão do título para o inglês: Development of conjugation method between the capsular polysaccharide serotype 1 of *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal surface protein A.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Polissacarídeo capsular sorotipo 1
3. Proteína de superfície pneumocócica A 4. Vacinas conjugadas I.
Tanizaki, Profa. Dra. Martha Massako II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB041/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Luciene Oliveira Machado.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de um método de conjugação entre o polissacarídeo capsular sorotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* e a proteína de superfície pneumocócica A.

Orientador(a): Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN**

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de uma vacina antipneumocócica pela conjugação PS1-PspA", protocolo nº 1007/13, sob a responsabilidade de Martha M. Tanizaki e Luciene O. Machado - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/6/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2013 - 12/2015	
Centro de Biotecnologia	90 camundongos Balb/c 3-7 sem, 15gr (F)

São Paulo, 20 de junho de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

***“Nenhum homem realmente produtivo
pensa como se estivesse escrevendo
uma dissertação.”***

Albert Einstein

***“Como é feliz o homem que acha a sabedoria,
o homem que obtém entendimento.”***

Provérbios 3:13

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de vivenciar essa experiência e pela conclusão dessa etapa.

Aos amigos e familiares, em especial à minha mãe pelo apoio frequente.

À Elena e Míriam, meu grupo de laboratório, e também à Patrícia, Carolina e Tiago.

À Pamela, Priscila, Eliane, Luciana e Fabíola, por toda a ajuda, principalmente pelo suporte às sangrias e também aos demais colegas do Central e da Fermentação.

À Viviane, Joaquim e Alexandre pelo disposição em ajudar.

À Marisa e Fátima pela agradável convivência ao longo desses anos.

Ao Enéas, pelos ensaios realizados, e por toda a disposição e ajuda com as discussões e correções.

À Comissão de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, de forma mais direta à Rosana e Kimie, pelo auxílio prestado.

À Dra Martha Tanizaki pela oportunidade e orientação, e à Dra Giovana Barazzzone.

Ao Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia - USP

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

RESUMO

MACHADO, L. O. **Desenvolvimento de um Método de Conjugação entre o Polissacarídeo Capsular Sorotipo 1 de *Streptococcus pneumoniae* e a Proteína de Superfície Pneumocócica A.** 2015. 99 f. – Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria encapsulada causadora de doenças infecciosas como pneumonia, bacteremia e meningite, infecções essas que estão entre as principais causas de morte entre crianças, idosos e imunodeprimidos, indivíduos que constituem o grupo de risco para tais infecções. Além dessas infecções, *S. pneumoniae* pode também causar otite média e sinusite. A vacinação tem sido a mais eficaz forma de conter tais infecções. As vacinas contra *S. pneumoniae* são compostas por polissacarídeos capsulares da bactéria, livres ou conjugados a proteínas que atuam como carreadoras. A vantagem das vacinas conjugadas em comparação às polissacarídicas é a capacidade de indução de uma resposta imune T-dependente o que garante proteção mesmo ao grupo de risco para infecções por *S. pneumoniae*. A proposta do projeto foi estabelecer um protocolo para obtenção de um conjugado constituído pelo polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 1 (PS1) e pela proteína de superfície pneumocócica A (PspA). O intuito desta proposta é a ampliação do espectro de ação da vacina contando com o PS1, sorotipo prevalente em várias regiões do mundo incluindo o Brasil, e a PspA, uma proteína da bactéria, também capaz de induzir resposta imune protetora. A síntese do conjugado empregou uma metodologia inédita para o sorotipo 1. Duas etapas desta metodologia envolveram o uso do DMT-MM como ativador de grupos carboxila. O rendimento para a etapa de conjugação esteve em torno de 30 % e o rendimento global do processo foi de 10%. A fragmentação do PS1 foi uma etapa que, embora tenha contribuído para a redução do rendimento global do processo, foi indispensável assim como a introdução do espaçador, sem o qual a conjugação não se estabeleceu. A técnica de dicroísmo circular foi aplicada para monitorar possíveis alterações do grau de estruturação do PS1 ao longo das etapas de modificação do polissacarídeo. A avaliação da resposta imune humoral induzida pelo conjugado mostrou a indução de IgG anti-PS1 gerada pelas imunizações com o conjugado PS1-PspA confirmando a atuação da PspA como proteína carreadora e mostrando que a metodologia empregada não comprometeu a imunogenicidade do PS1.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Polissacarídeo capsular sorotipo 1. Proteína de superfície pneumocócica A. Vacinas conjugadas.

ABSTRACT

MACHADO, L. O. **Development of a Conjugation Method between the Capsular Polysaccharide Serotype 1 of *Streptococcus pneumoniae* and pneumococcal surface protein A.** 2015. 99 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Streptococcus pneumoniae is an encapsulated bacterium causing infectious diseases such as pneumonia, bacteremia and meningitis. These infections are among the leading causes of death among children, elderly and immunocompromised persons, who are individuals from group of risk. *S. pneumoniae* can also cause otitis and sinusitis. The vaccination has been the more effective form to neutralize these infections. Vaccines against *S. pneumoniae* are constituted by free bacterial capsular polysaccharides or conjugated to proteins that act as carrier. Compared to vaccines of polysaccharides the advantage of conjugated vaccines, is its ability to induce a T-dependent immune response which provides protection even in groups of risk for infection by *S. pneumoniae*. The aim of this project was to establish a protocol to obtain a conjugate molecule consisting of the capsular polysaccharide of *S. pneumoniae* serotype 1 (PS1) and the pneumococcal surface protein A (PspA). The use of PspA as carrier allows the enlargement of vaccine spectrum since PspA, a bacterial surface protein, induces protective immune response. In the synthesis of conjugate DMT-MM was used in two steps as an activator of both carboxyl groups: from PspA and from PS1 and adipic acid dihydrazide was used as spacer. The yield of the conjugation step was around 30% and overall yield was 10%. Circular dichroism of PS1 was applied to verify possible conformational changes in the structure of PS1 along the modification steps. The conjugate induced anti-PS1 and anti-PspA IgG showing the double role of PspA: as carrier protein and vaccinal antigen.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Capsular Polysaccharide serotype 1. Pneumococcal Surface Protein A. Conjugate Vaccines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH – Dihidrazida do Ácido Adípico

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

ATCC – *The American Type Culture Collection*

BCA – Ácido Bicinchonínico

BSA – Albumina Bovina Sérica

CD – Dicroísmo Circular

CNBr – Brometo de Cianogênio

CRM₁₉₇ – Variante Mutada da Toxina Diftérica

DMT-MM - Cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino

E. coli – *Escherichia coli*

EDAC – Hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

g – grama

H. influenzae – *Haemophilus influenzae*

HCl – Ácido Clorídrico

Hyl – Hialuronidase

IgG – Imunoglobulina G

kDa - kilodáton

mdeg - miligraus

µg - micrograma

µl - microlitro

M - Molar

mg – miligrama

ml – mililitro

mM – milimolar

MHCII – Complexo de Histocompatibilidade de Classe II

nm – nanômetro

NaCl – Cloreto de Sódio

NaCNBH₃ – Ciano-boroidreto de Sódio

NaIO₄ – Meta-periodato de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de Amônio

N. meningitidis – *Neisseria meningitides*

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PBS-T – Tampão Fosfato-Salino acrescido de Tween 20 à 0,05%

Ply – Pneumolisina

PS – Polissacarídeo Capsular

PS1 – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 1

PS14 – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14

PS6B – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 6B

PS1hid – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 1 hidrolisado

PS1-AH – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 1 ligado ao ADH

PsaA – Antígeno de Superfície Pneumocócica A

PspA – Proteína de Superfície Pneumocócica A

PspA1 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 1

PspA3 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 3

PspC – Proteína de Superfície Pneumocócica C

PspAmod – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 1 modificada

PspA1mod – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 3 modificada

PspA3mod – Proteína de Superfície Pneumocócica A modificada

S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

T-dependente – Antígeno Timo Dependente

T-independente – Antígeno Timo Independente

TNBS – Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico

TT – Toxóide Tetânico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Método de Conjugação via Aminoação Redutiva. P_1 e P_2 representam cadeias polissacarídicas e R cadeias protéicas.	24
Figura 2 - Conjugação utilizando o Brometo de Cianogênio (CNBr). P representa cadeias polissacarídicas e R cadeias protéicas.	25
Figura 3 - Conjugação pelo método resultante da fusão dos dois métodos tradicionais. P_1 e P_2 representam cadeias polissacarídicas e R cadeias protéicas.	26
Figura 4 - Estrutura da unidade de repetição do PS1.	32
Figura 5 - Ilustração da unidade de repetição do PS1, sendo indicadas as ligações glicosídicas que podem ser rompidas com a hidrólise ácida.	49
Figura 6 - Ilustração das unidades de repetição dos polissacarídeos PS14 e PS6B.	51
Figura 7 - Cromatogramas dos produtos das hidrólises do PS1, em resina Sephacryl S-400, para 8:30 h e para 10 h de reação. O volume das reações foi de 5 ml.	53
Figura 8 - Cromatogramas, em resina Sephacryl S-400, do PS1 após hidrólise por 8:30 h, com volumes de reação de 5 e 10 ml.	54
Figura 9 - Cromatogramas do PS1 hidrolisado durante 10 h com 5 ml e 10 ml de volume de reação.	55
Figura 10 - Esquema ilustrando os testes de hidrólise para o PS1.	56
Figura 11 - Cromatogramas dos produtos de quatro diferentes hidrólises, realizadas sob as mesmas condições.	57
Figura 12 - Cromatograma da purificação do PS1 hidrolisado, em resina Sephadex G-25. A população separada aparece circulada no cromatograma.	58
Figura 13 - Perfil cromatográfico, em resina Sephacryl S-400, do PS1 nativo e do hidrolisado, após a purificação.	59
Figura 14 - Representação esquemática (A) da unidade de repetição do PS1, com seus grupos carboxila em destaque e (B) de uma molécula da dihidrazida do ácido adípico, com seus grupos hidrazida destacados em verde.	61
Figura 15 - Representação da reação entre PS1 e ADH.	61
Figura 16 - Esquema da reação empregada para modificação da PspA.	62
Figura 17 - Perfil de eluição da PspA1mod na resina Butyl sepharose.	64
Figura 18 - Perfil de eluição da PspA1mod nas resinas Octyl sepharose e Phenyl sepharose.	65
Figura 19 - Cromatograma da purificação da conjugação PS1- PspA em resina Phenyl sepharose.	66

Figura 20 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1-PspA por cromatografia por exclusão molecular em resina Sephacryl S-400 e resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para verificação do conjugado PS1 – PspA. O gel foi corado para proteína (Coomassie).	68
Figura 21 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1 – PspA em resina Sephacryl S-400 no qual houve uma ampliação do número de frações coletadas na região de eluição do conjugado, com frações de 0,6 ml nessa região e 2,2 ml após a eluição do conjugado.	69
Figura 22 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1-PspA em resina Sephacryl S-300. Esquema de coleta de frações de 3 ml. A população que corresponde ao conjugado PS1-PspA é indicado na figura.	70
Figura 23 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1-PspA em resina Sephacryl S-300. As frações coletadas na região de eluição do conjugado foram de 0,6 ml e 2,2 ml após eluição do conjugado.	70
Figura 24 - Cromatograma do produto da reação entre PS1hid e PspA3mod, em resina Sephacryl S-300.	72
Figura 25 - Modelo propondo que o PS1 apresenta estrutura tridimensional em hélice. Os grupos amina, presentes na estrutura desse polissacarídeo são representados pelas esferas localizadas na porção externa da hélice.	73
Figura 26 - Esquema demonstrativo da metodologia de um ensaio de ELISA de inibição, aplicado para verificação da antigenicidade de polissacarídeos. O soro empregado no ELISA é previamente inibido pelo antígeno.	75
Figura 27 - Resultados do ensaio de antigenicidade do PS1 nativo e após as modificações às quais foi submetido para a síntese do conjugado PS1-PspA.	76
Figura 28 - Espectro ^1H RMN para o PS1 hidrolisado, mostrando a região (2,2 ppm) onde ocorreria o sinal característico do grupo metila do o-acetil.....	78
Figura 29 - Comparação entre os espectros de CD adquiridos para o PS1 nativo (—), hidrolisado (—) e ligado ao ADH (—). Dados coletados em água e nas concentrações de 1 mg/ml. São mostradas as regiões dos espectros nas quais os sinais foram observados.....	80
Figura 30 - Análise do comportamento das estruturas de PS1 nativo (—), PS1 hidrolisado (—) e PS1-AH (—), quando submetidas à variação de temperatura. Em (A) são mostrados os valores para a situação de aumento da temperatura e em (B), para a redução da temperatura para os níveis originais.	82
Figura 31 - Títulos de IgG anti-PS1 nos soros provenientes de imunizações com os conjugados PS1-PspA (Conj 1 e Conj 2), com o co-administrado de PS1 e PspA (Co-adm) e com a vacina comercial Prevenar®. (ns) representa valores que não são significativamente diferentes. (*) indica diferenças significativas nos valores de títulos ($p < 0,05$).	87
Figura 32 - Títulos de IgG anti-PspA nos soros provenientes de imunizações com o conjugado PS1-PspA (Conj 1) e com o co-administrado de PS1 e PspA (Co-adm). (*) indica diferenças significativas nos valores de títulos ($p < 0,05$).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e fornecedores.	35
Tabela 2 - Condições de hidrólise para PS14 e PS6B.....	51
Tabela 3 - Pesos moleculares médios dos produtos de hidrólises de 8:30 h e de 10 h, para volumes de reação de 5 e de 10 ml.	55
Tabela 4 - Resultados das análises do PS1 por CD.	83
Tabela 5 - Resultados das análises por CD, comparativos entre PS1 nativo (PS1nat), PS1 hidrolisado (PS1hid) e PS1-AH.....	84
Tabela 6 - Grupos e composições de doses administradas nos ensaios imunes do conjugado PS1–PspA.	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 VACINAS CONJUGADAS: CONVERSÃO DA RESPOSTA T-INDEPENDENTE PARA T-DEPENDENTE	20
1.2 VACINAS ANTI-PNEUMOCÓCICAS	21
1.2.1 Vacinas Anti-pneumocócicas Polissacarídicas	21
1.2.2 Vacinas Anti-pneumocócicas Conjugadas	21
1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A OBTENÇÃO E EFICÁCIA DE VACINAS CONJUGADAS	22
1.3.1 Peso Molecular do Polissacarídeo	22
1.3.2 Métodos de Conjugação	23
1.3.3 Presença de Moléculas Espaçadoras	26
1.3.4 Purificação de Conjugados	27
1.3.4.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica	27
1.3.4.2 Cromatografia de Exclusão Molecular	28
1.4 PROTEÍNAS PNEUMOCÓCICAS COMO CARREADORAS	28
1.5 PROTEÍNA PNEUMOCÓCICA DE SUPERFÍCIE A	29
1.6 POLISSACARÍDEO CAPSULAR SOROTIPO 1	30
1.7 CONJUGAÇÃO PS1-PSPA	32
2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MODIFICAÇÕES DO PS1	37
3.1.1 Hidrólise do PS1	37
3.1.1.1 Estabelecimento das condições de hidrólise	37
3.1.1.2 Fragmentação por hidrólise ácida	37
3.1.2 Introdução da Molécula Espaçadora	37
3.2 MODIFICAÇÃO DA PSPA	38

3.3 REAÇÕES DE CONJUGAÇÃO	38
3.3.1 Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador e ADH como Espaçador	38
3.3.2 Método de Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador na Ausência de Espaçador	39
3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	39
3.4.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica	40
3.4.2 Cromatografia de Exclusão Molecular	40
3.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO PS1	41
3.5.1 Ensaios de Antigenicidade	41
3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear	42
3.5.3 Avaliação do PS1 por Dicroísmo Circular	43
3.6 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	43
3.6.1 Esquema de Imunização	43
3.6.2 Preparação dos Soro	44
3.6.3 Determinação de Títulos	44
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	45
3.7.1 Método Fenol-Sulfúrico	45
3.7.2 Método TNBS	46
3.7.3 Método BCA	46
3.7.4 Eletroforese (SDS-PAGE)	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO	48
4.1.1 Método de Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador e ADH como Espaçador	48
4.1.1.1 Modificações do PS1	49
4.1.1.1.1 Hidrólise do PS1	49
4.1.1.1.2 Introdução da Molécula Espaçadora	60

4.1.1.2 Modificação da PspA	62
4.1.1.3 Reação de Conjugação	62
4.1.1.4 Cromatografia por Interação Hidrofóbica	63
4.1.1.5 Cromatografia por Exclusão Molecular	66
4.1.2 Método de Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador na Ausência de Espaçador	71
4.1.2.1 Reação de Conjugação	71
4.1.2.2 Cromatografia por Exclusão Molecular	72
4.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO PS1	74
4.2.1 Avaliação da Antigenicidade das formas nativa e modificadas do PS1	74
4.2.2 Avaliação da alteração de grupos químicos da estrutura do PS1	77
4.2.3 Avaliação da alteração de grau de estruturação ou conformação do PS1	79
4.2.3.1 Dicroísmo Circular do PS1	79
4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL INDUZIDA PELO CONJUGADO PS1-PSPA.....	84
4.3.1 Avaliação da Resposta Imune Humoral anti-PS1	86
4.3.2 Avaliação da Resposta Imunológica anti-PspA3.....	88
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

Infecções por bactérias extracelulares encapsuladas, como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, estão entre as principais causas de morte em todo o mundo, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade entre crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos, grupos considerados de risco para tais infecções (BONTEN et al, 2015; BRICKS, 1994; KADIOGLU et al., 2008; MELO-CRISTINO; RAMIREZ; SERRANO, 2006).

Estimativas apontam que 2 milhões de crianças de idade inferior a 5 anos morrem, a cada ano, devido a infecções respiratórias agudas, sendo a maioria delas causada por *Streptococcus pneumoniae*, microrganismo que também pode causar otite média aguda ou sinusite, além de poder ser disseminado para outros focos - sistema nervoso central, espaço pleural, ossos e articulações, causando, nesses casos, bacteremia, meningite, peritonite osteomielite ou sepse (WILLIAMS et al., 2002; ELLIS; KLEIN, 1997).

O *Streptococcus pneumoniae*, ou pneumococo, é uma bactéria gram-positiva, encapsulada (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005) e anaeróbica aerotolerante (AUZAT et al., 1999). Do ponto de vista morfológico, o pneumococo é um diplococo que pode ser lanceolado ou em cadeias curtas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Sua superfície apresenta três estruturas constituintes: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica (KIM; WEISER, 1998).

A membrana plasmática do pneumococco é constituída por uma bicamada lipídica, na qual estão inseridas proteínas e moléculas de ácido lipoteicóico (DAWSON, 2004; KIM; WEISER, 1998).

A parede celular, composta de polissacarídeos e ácido teicóico, ancora diversas proteínas de superfície. O ácido teicóico – também conhecido como polissacarídeo C – apresenta resíduos de colina e é ligado ao peptideoglicano de sua superfície externa, a isto é atribuída a intensa resposta inflamatória gerada no hospedeiro durante infecções por pneumococo, através da ativação da via alternativa do sistema complemento e da produção de citocinas (DAWSON, 2004; TONNAER et al., 2006).

A cápsula polissacarídica compõe o envoltório externo do pneumococo, sendo constituída de polissacarídeo de elevado peso molecular, podendo também conter grupos fosfato e glicerol. É a cápsula que confere à bactéria proteção frente à

fagocitose, sendo por isso considerada seu principal fator de virulência (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Essa estrutura pode ainda inibir o reconhecimento de antígenos de superfície por IgG específico, o que previne a via clássica de ativação do complemento (DAWSON, 2004; HYAMS et al., 2010; KIM; WEISER, 1998). O modo pelo qual complemento e fagocitose são afetados pela cápsula polissacarídica não é ainda bem estabelecido, sendo os dados sobre isto ainda escassos e alguns poucos mecanismos sugeridos (HYAMS et al., 2010). Como visto, a cápsula do pneumococo contribui para sua sobrevivência e proliferação nos tecidos do hospedeiro. Além disso, permite a diferenciação dos sorotipos, pois varia em tamanho e composição química (DAWSON, 2004; KIM; WEISER, 1998; MALLEY, 2010). São atualmente identificados mais de 90 sorotipos de pneumococo que se diferenciam pela composição química do polissacarídeo capsular (KAMERLING, 2000). Por ser a cápsula polissacarídica o principal fator de virulência da bactéria, polissacarídeos capsulares de pneumococo são os antígenos mais utilizados em vacinas.

As vacinas são atualmente a medida mais aceita para conter o avanço de infecções por pneumococo (ECHÁNIZ-AVILÉS; SOLÓRZANO-SANTOS, 2001), uma vez que outras medidas mostram-se menos eficazes. O uso de antibióticos, por exemplo, pode acarretar o surgimento de um grande número de cepas resistentes. Além disso, por não se tratar de uma medida preventiva, não pode eliminar a possibilidade da ocorrência de sequelas.

Apesar da boa proteção obtida com o emprego das vacinas polissacarídicas, existem parcelas da população que não se beneficiam desta cobertura vacinal. Tais vacinas são pouco protetoras para o já mencionado grupo de risco. (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004; BONTEN et al, 2015; VLIEGENTHART, 2006).

Isso ocorre porque os polissacarídeos são antígenos timo-independentes (T-independente) logo, não induzem memória imunológica (POLAND, 1999; VLIEGENTHART, 2006). Nesse contexto, surgiu a alternativa de ligar quimicamente os polissacarídeos capsulares a proteínas carreadoras, gerando moléculas capazes de induzir memória imunológica, por atuarem como antígenos timo-dependentes (T-dependente) (SCHMOLE-THOMA et al., 2008; WEINBERGER et al., 2012). Esse processo tem permitido obter as chamadas vacinas conjugadas que podem ser administradas em substituição às vacinas polissacarídicas, e conferem proteção

mesmo aos grupos de risco (SCHMOLE-THOMA et al., 2008; WEINBERGER et al., 2012).

1.1 VACINAS CONJUGADAS: CONVERSÃO DA RESPOSTA T-INDEPENDENTE PARA T-DEPENDENTE

Por serem os polissacarídeos constituídos pela repetição de unidades compostas por um número pequeno de açúcares, estes apresentam epítomos repetitivos. A presença desses epítomos repetitivos faz com que ocorra, por parte do sistema imune do organismo infectado, uma ativação direta de células B, não sendo recrutadas células T auxiliares. Com isso, a síntese de anticorpos se dá de forma independente de células T, caracterizando a denominada resposta imune T-independente na qual não há geração de memória imunológica (BAKER, 1992; KARANKI; KAYHTY; MAKELA, 1984).

Já no caso de proteínas, a resposta imune ocorre em um contexto dependente de MHCII – via II do complexo maior de histocompatibilidade. Neste caso, para que ocorra produção de anticorpos, proteínas precisam ser fragmentadas a peptídeos que se associam com proteínas do MHCII. Células apresentadoras de antígenos são responsáveis pela apresentação destes antígenos a células T e somente após esta apresentação é que células B são estimuladas para a produção de anticorpos. Através desta via de síntese de anticorpos ocorre geração de resposta imune T-dependente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Quando administradas vacinas conjugadas, as células B que se unem ao polissacarídeo promovem a internalização do conjugado proteína-polissacarídeo. No interior das células B ocorre o processo de fragmentação da proteína carreadora em peptídeos que serão apresentados ao MHCII, o que resulta na ativação de células T (BOGAERT et al., 2004; GONZÁLEZ, A., 2008), como foi descrito acima. No entanto, nesse caso, ocorre também a apresentação do polissacarídeo – covalentemente ligado à proteína – ao MHCII.

Vacinas conjugadas são, portanto, capazes de induzir resposta imune T-dependente, através da cooperação entre células B e células T (BOGAERT et al., 2004; GONZÁLEZ, A., 2008; SCHMOLE-THOMA et al., 2008).

1.2 VACINAS ANTIPNEUMOCÓCICAS

Como já mencionado, as vacinas anti-pneumocócicas podem ser de dois tipos, com base em suas constituições: vacinas anti-pneumocócicas polissacarídicas – cuja composição apresenta apenas polissacarídeos livres – e vacinas anti-pneumocócicas conjugadas – compostas por polissacarídeos covalentemente ligados a proteínas que atuam como carreadoras.

1.2.1 Vacinas Antipneumocócicas Polissacarídicas

A indução de anticorpos contra polissacarídeos capsulares é soro específica (BRICKS, 1994; LEE et al., 2014), não havendo reação cruzada. Isso implica na necessidade de que, vacinas que tenham como antígeno o polissacarídeo capsular sejam compostas por um número variado de polissacarídeos, pertencentes aos sorotipos mais prevalentes. Isso, para que o organismo imunizado possa desenvolver proteção contra cada um destes sorotipos (LEE et al., 2014).

A primeira vacina antipneumocócica, composta por 14 polissacarídeos capsulares (14-valente), foi lançada no ano de 1977 sendo substituída, em 1983, pela vacina 23-valente constituída por um número ainda maior de polissacarídeos capsulares (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) e que atualmente é disponibilizada com os nomes de Pneumovax 23 (Merk Sharp & Dohme, Whitehouse Station, N. J., EUA) e Pneumo 23 (Sanofi Pasteur AS, Lyon, França) (BUTLER et al., 1993).

1.2.2 Vacinas Antipneumocócicas Conjugadas

A primeira vacina conjugada, uma vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b, só foi licenciada em 1980, embora o processo de conjugação entre uma proteína e um polissacarídeo tenha sido pela primeira vez descrito por Goebel e Avery, em 1920 (AVERY; GOEBEL; TILLET, 1929). As primeiras vacinas conjugadas eram constituídas pelo polissacarídeo capsular de *H. influenzae* tipo b (Hib) e tinham como proteínas carreadoras o toxóide tetânico (TT), a toxina diftérica inativada (CRM₁₉₇) e vesículas de membrana externa da *N. meningitidis*, tendo sido testadas com grande sucesso nos anos 80 (KNISKERN; MARBURG, 1994).

O sucesso das vacinas anti-hemófilus no controle de epidemias de meningite, nos Estados Unidos e em muitos países da Europa, contribuiu para que a conjugação química fosse adotada no processo de produção de vacinas antimeningocócicas e, posteriormente, na produção de vacinas antipneumocócicas. No ano 2000, a Prevenar® (Wyeth Lederie Vaccines, Louvain-la-Nueve, Bélgica), vacina conjugada antipneumocócica 7-valente, constituída pelos polissacarídeos capsulares 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados à proteína CRM₁₉₇, foi licenciada nos Estados Unidos. Posteriormente foram lançadas vacinas conjugadas antipneumocócicas 11-valente, uma produzida pela Sanofi-Aventis, que utiliza toxóide tetânico e toxina diftérica como carreadores protéicos, e a PCV11-PD, fabricada pela GlaxoSmithKline`s, com a proteína D de *Haemophilus influenzae* como proteína carreadora.

É característica das vacinas conjugadas a presença de um número limitado de proteínas carreadoras – como as já citadas toxóide tetânico, toxina diftérica, ou sua forma mutante (CRM₁₉₇), o complexo protéico de membrana externa de *N. meningitidis* (OMV), e a recentemente introduzida proteína D de *Haemophilus influenzae*. No entanto, o emprego de um carreador protéico comum a diferentes vacinas pode levar à supressão da resposta imune. Esta supressão decorre do fato de que a presença de uma resposta T de memória, resultante de uma primeira imunização contra um epítipo comum do carreador, pode impedir que seja gerada resposta imunológica frente a uma segunda vacina conjugada administrada. Quando um mesmo carreador protéico é usado para mais de um sorotipo, em uma vacina multivalente, pode haver interferência nas respostas desenvolvidas contra esses sorotipos (LAFERRIERE et al, 1997; POOLMAN, 2005). Assim, fica claro que a maior eficácia de uma resposta imune, no caso de vacinas conjugadas, resulta de uma combinação ótima entre polissacarídeo capsular e proteína carreadora.

1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A OBTENÇÃO E EFICÁCIA DE VACINAS CONJUGADAS

1.3.1 Peso Molecular do Polissacarídeo

Os polissacarídeos, em sua forma nativa, apresentam elevado peso molecular o que pode conferir a estes, bem como aos conjugados com eles sintetizados, baixa

solubilidade em meio aquoso. Essa baixa solubilidade, e em alguns casos até mesmo insolubilidade, representa uma propriedade indesejável tanto para polissacarídeos como para o conjugado (WANG et al., 2003), o que faz com que a fragmentação seja uma etapa muitas vezes indispensável.

Outro fator que torna desejável o trabalho com polissacarídeos de peso molecular reduzido é uma maior facilidade na etapa de purificação do conjugado (FRASCH; LEES; PUVANESARAJAH, 2008).

A idéia da obtenção de conjugados a partir de polissacarídeos fragmentados é suportada pelo fato de que, embora os polissacarídeos bacterianos sejam constituídos por uma repetição de centenas ou milhares de oligossacarídeos, seus determinantes estruturais antigênicos são fragmentos específicos desses oligossacarídeos e não o polímero ou polissacarídeo como um todo (WANG et al., 2003). No entanto, não se pode eliminar a possibilidade de que, com a redução de peso molecular – caso esta seja muito significativa e o polissacarídeo seja reduzido a um número muito pequeno de unidades de repetição –, epítomos conformacionais característicos da forma nativa sejam eliminados (KREISMAN et al., 2006).

Além desse aspecto da perda de epítomos conformacionais, deve ser considerada a possibilidade de que, dependendo da técnica empregada, a fragmentação também afete a estrutura do polissacarídeo levando a um comprometimento de grupos imunogênicos, comprometendo também sua atuação como antígeno vacinal (WANG et al., 2003).

Por esta razão, se faz necessária uma avaliação da integridade dos grupos imunogênicos do polissacarídeo, após processos de fragmentação.

1.3.2 Métodos de Conjugação

Atualmente, a maior parte das vacinas conjugadas tem sido obtida por um dos dois métodos seguintes: o método de conjugação via aminação redutiva e o método de conjugação com brometo de cianogênio (CNBr).

No método da aminação redutiva, hidroxilas vicinais do polissacarídeo são oxidadas a aldeído, mediante reação com metaperiodato de sódio (NaIO_4). Esses grupos aldeídos podem reagir com grupamentos amina da proteína, formando uma base de Schiff que é reduzida para a formação de um composto mais estável. Nessa etapa, o cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3) é empregado como agente redutor

(LAFERRIERE et al., 1997). A Figura 1 mostra as etapas reacionais envolvidas no método de conjugação via aminação redutiva.

Figura 1 - Método de Conjugação via Aminoação Redutiva. P₁ e P₂ representam cadeias polissacarídicas e R cadeias protéicas.

No método de conjugação com o Brometo de Cianogênio (CNBr), hidroxilas vicinais do polissacarídeo são ativadas pelo CNBr. O polissacarídeo ativado reage com a dihidrazida do ácido adípico (ADH), promovendo a introdução de grupos amina na estrutura do polissacarídeo.

Os grupos amina do polissacarídeo assim constituído, polissacarídeo derivatizado, podem reagir com grupamentos carboxila da proteína, gerando o conjugado. Para a conjugação as carboxilas da proteína são ativadas por um agente ativador, o EDAC (SHAFFER et al., 2000). As etapas reacionais desse método são esquematizadas na Figura 2.

Dentre as vacinas cujos processos de produção empregam os métodos citados encontram-se a Hiberix[®] (Hib-Toxoide tetânico) e a Prevenar[®] (vacina heptavalente contra o pneumococo na qual os polissacarídeos sorogrupos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F estão ligados ao carreador proteico CRM₁₉₇), produzidas com a

utilização dos métodos de ativação pelo CNBr e de aminação reductiva, respectivamente (SCHNEERSON et al., 1986).

Método do Brometo de Cianogênio (CNBr)

I. Ativação do polissacarídeo

II. Derivatização do polissacarídeo

III. Reação do polissacarídeo derivatizado com a proteína

Figura 2 - Conjugação utilizando o Brometo de Cianogênio (CNBr). P representa cadeias polissacarídicas e R cadeias protéicas.

Um novo método, baseado na fusão dos dois métodos clássicos descritos anteriormente, tem sido aplicado em nosso laboratório com algumas adaptações. O novo método envolve uma etapa de oxidação das hidroxilas vicinais do polissacarídeo, com posterior derivatização através da reação com o ADH. A conjugação se dá pela reação do polissacarídeo derivatizado com a proteína, em presença de EDAC que é o ativador da proteína. Em nosso laboratório este método tem sido empregado, com a substituição do hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil-carbodiimida (EDAC) pelo 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil morfolino (DMT-MM) na ativação das carboxilas protéicas (BARAZZONE et al., 2009). A Figura 3 ilustra as etapas reacionais deste método.

Figura 3 - Conjugação pelo método resultante da fusão dos dois métodos tradicionais. P_1 e P_2 representam cadeias polissacarídicas e R cadeias protéicas.

1.3.3 Presença de Moléculas Espaçadoras

A maior parte dos métodos de conjugação atualmente empregados envolve uma molécula que tem sido denominada molécula espaçadora ou espaçador, que pode ser introduzida na estrutura do polissacarídeo ou da proteína a serem conjugados. Moléculas espaçadoras, no contexto de conjugações, são comumente empregadas para a introdução de grupos reativos na estrutura dos elementos a serem conjugados. Como exemplo tem-se os já mencionados métodos de conjugação com Brometo de Cianogênio e o método resultante da fusão dos dois métodos tradicionais, nos quais a ligação com a molécula espaçadora promove a introdução de grupos amina na estrutura do polissacarídeo, possibilitando a conjugação com a proteína.

A presença de espaçadores tem sido ainda explorada para favorecer outros aspectos nos processos de conjugação. Em alguns casos, o espaçador pode contribuir para um aumento da reatividade e ainda atuar na minimização de possíveis impedimentos estéricos ao acoplamento entre polissacarídeo e proteína (STEFANETTI et al., 2014).

Existe ainda a possibilidade de que espaçadores possam favorecer a indução de resposta imune, uma vez que a conjugação pode tornar inacessíveis ou obstruídos epítomos de polissacarídeos ou proteínas. O maior espaçamento entre os elementos conjugados, promovido pela molécula espaçadora, pode impedir ou ao menos reduzir esta ocorrência indesejada (HUANG et al., 2013).

O comprimento do espaçador é também uma propriedade que pode influenciar na síntese do conjugado, na relação entre as massas de polissacarídeo e proteína no conjugado obtido ou ainda na geração da resposta imune (HUANG et al., 2013).

1.3.4 Purificação de Conjugados

A purificação é uma etapa relevante do processo de obtenção de um conjugado, haja vista que o polissacarídeo não conjugado pode agir como supressor da resposta dependente de células T auxiliares (KALLENIOUS; PAWLOWSKI; SVENSON, 2000).

Das técnicas que se podem empregar para purificação de conjugados, destacamos duas técnicas cromatográficas que podem garantir separação satisfatória entre elementos livres e conjugados: a cromatografia por interação hidrofóbica e a cromatografia por exclusão molecular.

1.3.4.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

O princípio desta técnica é a interação hidrofóbica das moléculas com os ligantes constituintes da matriz da resina. A ligação ocorre entre regiões não polares na superfície das moléculas e a matriz hidrofóbica da resina (CABRAL; QUEIROZ; TOMAZ, 2001; FAUSNAUGH, 1984), sendo a concentração de sal, na fase móvel, responsável pelo aumento ou redução da intensidade dessas interações. Como a

hidrofobicidade é uma característica bastante particular de cada molécula, esta técnica cromatográfica promove purificações bastante seletivas, nas quais a molécula que se deseja purificar é satisfatoriamente isolada das demais. Outra vantagem desta técnica é a manutenção da integridade das moléculas a ela submetidas, garantindo a manutenção da atividade (CABRAL; QUEIROZ; TOMAZ, 2001), o que no caso de conjugados é de grande importância.

1.3.4.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

Na técnica de cromatografia de exclusão molecular a fase móvel promove o deslocamento das moléculas através da matriz da resina, que apresenta poros de diferentes diâmetros. A passagem do material por esses poros é que possibilita a separação, já que as moléculas migram diferentemente pela resina de acordo com seus diferentes pesos moleculares, sendo, portanto, eluídas em volumes distintos (CONN, E.E; STUMPF, P. K., 1975).

A cromatografia por exclusão molecular, por resultar na separação de moléculas de diferentes pesos moleculares, pode ser aplicada na purificação de conjugados, já que estes apresentam peso molecular consideravelmente maior do que o de polissacarídeo e proteína livres.

Uma vantagem da cromatografia por exclusão molecular para a purificação do conjugado é, assim como na interação hidrofóbica, a manutenção da integridade das moléculas.

1.4 PROTEÍNAS PNEUMOCÓCICAS COMO CARREADORAS

As vacinas antipneumocócicas, como visto anteriormente, necessitam conter em suas formulações um número amplo de polissacarídeos, correspondentes aos sorotipos de maior prevalência, para que seja garantida uma cobertura eficiente dos sorotipos circulantes na população. A cobertura vacinal com estas formulações tem se mostrado satisfatória, mas como se sabe, ao longo do tempo, ocorre a substituição dos sorotipos prevalentes na população, o que torna necessário o desenvolvimento de novas formulações, que respondam às demandas que se apresentam (LEE et al., 2014; MEHR; WOOD, 2012; WEINBERGER et al., 2011).

Uma alternativa promissora para contornar este inconveniente seria a substituição das tradicionais proteínas carreadoras, como a CRM₁₉₇, por proteínas próprias do pneumococo. O uso de proteínas pneumocócicas, por serem fatores de virulência da bactéria e por se apresentarem conservadas entre os diversos sorotipos, permitiria empregar um número reduzido de polissacarídeos nas vacinas conjugadas (MUSHER, 2013).

O uso de um número reduzido de polissacarídeos nas vacinas conjugadas tem ainda como vantagem a eliminação da já mencionada possibilidade de interferência das respostas contra diferentes sorotipos, quando se utiliza um mesmo carreador em uma vacina multivalente.

Nesse contexto, a proposta do grupo de trabalho tem sido uma nova abordagem vacinal baseada na conjugação dos três sorotipos de maior prevalência no Brasil – sorotipos 1, 14 e 6B, prevalentes na época do estabelecimento do projeto – com a Proteína de Superfície pneumocócica A (PspA). Esses sorotipos (1, 14 e 6B) estiveram no grupo dos que mais acometiam as populações de países da América Latina, sendo os mais prevalentes no Brasil, segundo uma avaliação realizada entre os anos de 2000 e 2005 (CASTAÑEDA et al., 2009). No entanto, como já foi mencionado, o perfil de prevalência dos sorotipos de pneumococo varia de acordo com uma série de fatores. Um estudo recente indicou a redução da ocorrência de doenças pneumocócicas infecciosas causadas pelos sorotipos constituintes da vacina anti-pneumocócica Synflorix® 10-valente, após sua introdução no Brasil (SANTOS et al., 2013).

1.5 PROTEÍNA PNEUMOCÓCICA DE SUPERFÍCIE A

A superfície da parede celular do pneumococo apresenta proteínas que estão envolvidas com a patogenicidade do microrganismo durante a infecção. Entre elas estão a autolisina (LytA), o antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA) e as proteínas de superfície pneumocócicas A e C (PspA e PspC) (BRILES et al., 1996; MUSHER, 2013).

A Proteína pneumocócica de superfície A (PspA), é considerada indispensável à virulência do pneumococo, contribuindo para as propriedades anti-opsonofagocíticas da bactéria (BRILES et al., 1996). A PspA também apresenta a

capacidade de inibir a deposição de complemento e a morte por apolactoferrina (SHAPER et al., 2004).

Análises de PspAs de diferentes cepas mostraram que estas apresentam uma variabilidade na sequência N-terminal que recebe a denominação de região definidora de clado (CDR) (BECKER, BRILES; HOLLINGSHEAD, 2000). Com base nas diferenças desta região, as PspAs são classificadas em famílias e clados (BRANDILEONE et al., 2004; VELA CORAL et al., 2001). Os clados 1 e 2 são pertencentes à família 1, os clados 3, 4 e 5 à família 2 e o clado 6 à família 3.

Embora haja esta diferenciação em famílias e clados, as PspAs compartilham muitos epítomos de reatividade cruzada, e já foi mostrado que imunizações com uma única PspA geram proteção cruzada (VELA CORAL et al., 2001).

A PspA é constituída por cinco domínios: um domínio peptídeo sinal, um domínio alfa-hélice, um domínio rico em prolina, um domínio ligado à colina e uma curta cauda C-terminal. Dentre estes, destaca-se a importância do domínio alfa-hélice, que se relaciona com a exposição da PspA na superfície do pneumococo. De modo sucinto, o que ocorre é uma interação da porção positiva do domínio alfa-hélice com regiões negativas do polissacarídeo capsular da bactéria. Já a porção negativa do domínio é repelida pelo polissacarídeo. Disso resulta a exposição, na superfície do pneumococo, do domínio alfa hélice da PspA. A exposição da PspA na superfície do pneumococo leva à indução de anticorpos protetores - que são gerados contra este domínio alfa-hélice. Disto decorre a característica antigênica da PspA. (BECKER; BRILES; HOLLINGSHEAD, 2000; DANIELS et al., 2006).

1.6 POLISSACARÍDEO CAPSULAR SOROTIPO 1

Dentre as biomoléculas de maior ocorrência na natureza estão os carboidratos, moléculas que são predominantemente poliidroxiáldeídos ou poliidroxicetonas ou que, quando hidrolisadas, originam esses compostos. Boa parte dos carboidratos apresenta fórmula molecular empírica $(CH_2O)_n$ podendo também ter em suas composições nitrogênio, fósforo ou enxofre (CONN, E.E; STUMPF, P. K., 1975).

Carboidratos constituídos por uma única cadeia recebem a denominação de monossacarídeo. Os monossacarídeos são constituídos por cadeia carbônica não ramificada e, na forma de cadeia aberta, ocorrem grupos carbonilas e hidroxilas, que

podem formar uma ligação covalente originando as cadeias cíclicas dos carboidratos. O átomo de carbono da carbonila recebe o nome de carbono anomérico (CONN, E.E; STUMPF, P. K., 1975).

Os carboidratos podem também ser constituídos por cadeias de monossacarídeos, constituindo oligossacarídeos – quando compostos por cadeias curtas – ou polissacarídeos – compostos por mais de 20 monossacarídeos.

As ligações glicosídicas são as ligações que unem as unidades de açúcares que vão compor os oligossacarídeos e os polissacarídeos. Tais ligações resultam da reação entre o carbono anomérico de uma molécula e a hidroxila de uma segunda molécula. Ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas em meio ácido, por ruptura da ligação do carbono anomérico (CONN, E.E; STUMPF, P. K., 1975).

Como já foi mencionado, a cápsula de bactérias é constituída por polissacarídeos que, de acordo com suas constituições, permitem a diferenciação em sorotipos. No presente trabalho será estudada uma conjugação envolvendo o sorotipo 1 de pneumococo.

Embora sua prevalência varie com relação ao tempo e ao espaço geográfico, como ocorre com os demais sorotipos, o polissacarídeo sorotipo 1 (PS1) está entre os mais comuns dentre os causadores de doenças infecciosas, sendo associado à pneumonia grave desde 1913 (BRUEGGEMANN; SPRATT, 2003; MEHR; WOOD, 2012). O PS1 é um dos poucos sorotipos de pneumococo associado a surtos da doença em comunidades pequenas ou fechadas. Estudos recentes o têm apontado como o sorotipo que mais tem causado pneumonia em crianças, sendo ainda associado a doenças como peritonite (BRUEGGEMANN; SPRATT, 2003; RITCHIE, 2012).

O polissacarídeo capsular sorotipo 1 é constituído pela repetição do trissacarídeo $\rightarrow 3) \alpha$ -2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactose (1 $\rightarrow$ 4) α -D-ácido galacturônico (1 $\rightarrow$ 3) α -D-ácido galacturônico (1 $\rightarrow$, e ainda por uma quantidade não estequiométrica de grupos O-acetil (ABEYGUNAWARDANA et al., 2000; STROOP et al., 2002). A estrutura da unidade de repetição do PS1 é mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura da unidade de repetição do PS1.

O PS1 faz parte de uma classe incomum de polissacarídeos, caracterizados por possuírem grupos carregados positiva e negativamente, sendo, portanto, pertencente a um grupo que tem sido denominado de polissacarídeos zwitteriônicos (KALKA-MOLL et al., 2002; RITCHIE, 2012; TZIANABOS, et al., 2000). Tais polissacarídeos têm sido apontados como possuidores de características imunogênicas particulares (GALLORINI et al., 2009; KALKA-MOLL et al., 2002; RITCHIE et al., 2012; TZIANABOS et al., 2000). Estudos recentes, envolvendo esses antígenos zwitteriônicos, mostraram que, quando empregados em conjugações, promovem aumento da imunogenicidade, em comparação com casos nos quais se emprega polissacarídeos não zwitteriônicos (GALLORINI et al., 2009). Tem sido relatado também que polissacarídeos zwitteriônicos, devido à presença das cargas positivas e negativas, de modo análogo às proteínas, ativam células T em culturas de monócitos. Esta ativação ocorre via MHC II (GALLORINI et al., 2009).

1.7 CONJUGAÇÃO PS1-PSPA

Embora estudos recentes tenham apontado a capacidade de polissacarídeos zwitteriônicos de induzirem resposta dependente de células T, mesmo na ausência de uma proteína carreadora, também já foi mostrado que nesses casos, de ausência de carreador, não ocorre geração de células B - células responsáveis pela geração de memória imunológica – em humanos (TRÜCK, J. et al., 2012). Não ocorrendo uma resposta imune resultante de uma cooperação de células T e B, torna-se

necessária a conjugação do PS1 a uma proteína carreadora, para promover uma resposta decorrente desta cooperação – que é gerada para conjugados do modo descrito no item 1.1.

Além disso, o objetivo comum dos estudos do grupo é explorar a vantagem de conjugações dos polissacarídeos com a PspA, proteína que é fator de virulência da bactéria, visando o desenvolvimento de uma vacina mais protetora. Logo, se desejou avaliar com esse trabalho a resposta anti-PspA, e não só a resposta anti-PS1.

Ainda nesse contexto, a conjugação com o PS1 poderia ser também vantajosa por ter sido observado que a presença de grupos carregados positiva e negativamente na estrutura de polissacarídeos faz com que, quando conjugados, promovam um aumento na resposta gerada frente à proteína carreadora (GALLORINI et al., 2009).

Além disso, buscou-se empregar um método de conjugação alternativo para o PS1, que apresentasse diferenças entre o já empregado na síntese da vacina conjugada comercial, que envolve o processo de aminação reductiva (HAUSDORFF et al., 2009).

2 OBJETIVOS

- Estabelecer um protocolo para obtenção e purificação de um conjugado entre o polissacarídeo capsular de pneumococo sorotipo 1 (PS1) e a proteína de superfície pneumocócica A (PspA).
- Avaliar a resposta imunológica humoral gerada pelo conjugado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados no presente trabalho e seus respectivos fornecedores são listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes e fornecedores.

Reagente	Fornecedor
Acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	Labsynth
Ácido bicinchonínico (BCA)	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico (HCl)	Labsynth
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	Labsynth
Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS)	Sigma-Aldrich
Butyl Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
Cianoborohidreto de sódio (NaBH_3CN)	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio (NaCl)	Dinâmica Química
Cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM)	Sigma-Aldrich
Coomassie blue	Sigma-Aldrich
Dextranas	Sigma-Aldrich
Dihidrazida do ácido adípico (ADH)	Sigma Chemical
Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)	Casa da Química
Formaldeído (HCHO)	Labsynth
Fosfato de sódio (Na_2HPO_4)	Sigma Chemical
Hidróxido de sódio (NaOH)	Casa da Química
IgG anti-camundongo conjugado à peroxidase	Sigma Chemical
IgG anti-coelho conjugado à peroxidase	Sigma Chemical
Leite em pó desnatado Molico [®]	Nestlé

Octyl Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
Orto-fenildiamina (OPD)	Sigma Chemical
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	Sigma Chemical
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
Polissacarídeo sorotipo 14 (PS14)	ATCC
Polissacarídeo sorotipo 1 (PS1)	ATCC
Sephacryl S-300	GE Healthcare
Sephacryl S-400	GE Healthcare
Sephadex G-25	GE Healthcare
Soro anti-PS1	Serum Staten Institute
Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	Jand Química
Twenn 20	Labsynth

PS1 - O polissacarídeo sorotipo 1 (PS1) de *S. pneumoniae* foi fornecido pelo grupo da Dr^a Viviane M. Gonçalves, do Laboratório de Bioprocessos pertencente ao Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. Foram realizadas nesse laboratório as etapas de cultivo da bactéria e purificação do referido polissacarídeo (MARTHOS, 2012). Para algumas análises, como controle foi empregado o PS1 comercial.

PspA1 e PspA3 - As proteínas de superfície A, clado 1 (PspA1) e clado 3 (PspA3), do *S. pneumoniae*, foram também fornecidas pelo grupo da Dr^a Viviane M. Gonçalves, que realizou o trabalho de purificação destas proteínas. A PspA, enviada para purificação no Laboratório de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia, se trata de uma proteína recombinante, de construção obtida pelo grupo da Dr^a Luciana C. Leite, do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (CARVALHO et al., 2009).

O cultivo do microrganismo e expressão da proteína, com a construção anteriormente mencionada, foram realizadas pelo grupo da Dr^a Teresa Zangirolami, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

A PspA1 foi utilizada nos ensaios de síntese do conjugado que foi analisado por cromatografia de interação hidrofóbica. Nos demais estágios trabalhou-se com a PspA3. Como as PspAs apresentam proteção cruzada os resultados podem ser extrapolados para PspAs de famílias e clados diferentes.

3.1 MODIFICAÇÕES DO PS1

3.1.1 Hidrólise do PS1

3.1.1.1 Estabelecimento das condições de hidrólise

O PS1 foi submetido a testes de hidrólise em meio ácido (HCl 1M), em sistema de refluxo, com o meio reacional sob agitação e aquecimento constantes. Para aquecimento, o meio reacional permaneceu – em balão volumétrico - em banho de silicone a temperaturas entre 80 e 85° C. A concentração do PS1 nas reações foi de 5 mg/ml.

3.1.1.2 Fragmentação por hidrólise ácida

Estabelecidas as condições de hidrólise, o PS1 foi submetido a 8 h de hidrólise ácida nas condições descritas acima, fixando-se a massa total de polissacarídeo em 100 mg.

Para interrupção da reação, o meio reacional foi transferido para banho de gelo e procedeu-se adição de NaOH, até que fosse atingida a neutralidade (pH 7).

A determinação do peso molecular médio da população de PS1 hidrolisado (PS1hid) foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400, previamente calibrada com dextranas de diferentes pesos moleculares. A purificação do produto (PS1hid), se deu pela mesma técnica cromatográfica, porém com a resina Sephadex G-25.

3.1.2 Introdução da Molécula Espaçadora

O PS1, previamente hidrolisado, reagiu com o ADH (100 mM) na presença do DMT-MM (50 mM) em meio tamponado (Na_2HPO_4 100 mM, pH 8,5), sob agitação

magnética e à temperatura ambiente, durante 19 h. A concentração do PS1 hidrolisado na reação foi de 10 mg/ml.

O produto (PS1-AH) foi purificado por cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-25.

A ligação de moléculas de ADH ao polissacarídeo foi avaliada pelo método colorimétrico TNBS, que será descrito posteriormente.

Para os cálculos dos rendimentos das etapas de hidrólise e de introdução do espaçador foi utilizada a relação $(m_{fPS}/m_{iPS}) \times 100$, onde m_{iPS} é a massa de polissacarídeo inicial na reação e m_{fPS} a massa de polissacarídeo restante ou recuperada ao final da etapa.

3.2 MODIFICAÇÃO DA PSPA

Os resíduos de lisina da PspA foram protegidos por reação com formaldeído a 5% (v/v). Ao meio reacional foram adicionados 500 µl de NaBH₃CN 5M em solução de NaOH 0,2% (m/v). A concentração da PspA foi de 10 mg/ml e 50 ml o volume de reação. A reação foi mantida por 24 h, à temperatura ambiente e sob agitação magnética.

A proteína modificada foi dialisada, em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 5 mM, pH 7,0). O grau de modificação da PspA foi avaliada pelo método TNBS.

3.3 REAÇÕES DE CONJUGAÇÃO

3.3.1 Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador e ADH como Espaçador

A reação de conjugação entre o polissacarídeo ligado à molécula espaçadora (PS1-AH) e a proteína modificada (PspAmod) foi realizada em meio tamponado (Na₂HPO₄ 100 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5). Como agente ativador foi empregado o DMT-MM (100 mM). A relação entre as massas de proteína e polissacarídeo na reação foi de 2:1 ou 1:1. As concentrações de polissacarídeo e proteína na reação de conjugação foram ambas de 5 mg/ml e 3 ml o volume de reação. A reação se deu sob agitação magnética e à temperatura ambiente por 24 h.

A reação foi interrompida pela adição de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (100 mM) ao meio reacional, seguida de agitação magnética por 30 min.

O cálculo do rendimento da etapa de conjugação foi realizado com base nas massas de polissacarídeo, por meio da relação $(m_{\text{fPS}}/m_{\text{iPS}}) \times 100$, onde m_{iPS} é a massa inicial de polissacarídeo na reação e m_{fPS} a massa de polissacarídeo restante ou recuperada ao final da etapa. O rendimento global do processo de conjugação foi calculado pelo produto dos rendimentos das etapas envolvidas no processo, tendo sempre como base as massas de polissacarídeo.

3.3.2 Método de Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador na Ausência de Espaçador

A reação de conjugação entre o polissacarídeo hidrolisado (PS1hid) e a proteína modificada (PspAmod) foi realizada em meio tamponado (Na_2HPO_4 100 mM, NaCl 300 mM, pH 8,5 ou 9,5). Como agente ativador foi empregado o DMT-MM (100 mM). A relação entre as massas de proteína e polissacarídeo na reação foi de 1:1. As concentrações de polissacarídeo e proteína na reação de conjugação foram ambas de 5 mg/ml e 3 ml o volume de reação. A reação se deu sob agitação magnética e à temperatura ambiente por 24 h.

A reação foi interrompida pela adição de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (100 mM) ao meio reacional, seguida de agitação magnética por 30 min.

3.4 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

A purificação e análise da formação dos conjugados foram realizadas por técnicas cromatográficas. Além disso, a cromatografia também foi útil para purificação de produtos reacionais de outras etapas, bem como para a determinação do peso molecular médio das populações do polissacarídeo.

As resinas foram empacotadas em colunas cromatográficas, de acordo com as instruções do fabricante, específicas para cada resina, e em todos os casos foi utilizado o sistema Akta prime (GE Healthcare). Amostras das frações coletadas foram submetidas a métodos colorimétricos para monitoramento da presença de polissacarídeo e proteína, permitindo a construção dos cromatogramas.

3.4.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Butyl Sepharose - Para os processos de purificação, a resina Butyl Sepharose 6 Fast Flow foi previamente equilibrada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M, sendo empregado para a eluição um gradiente decrescente de 1 M a 0 M do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O fluxo de trabalho foi de 2,5 ml/min e foram coletadas frações de 3 ml.

Octyl e Phenyl Sepharose - Para as resinas Octyl Sepharose 6 Fast Flow e Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, a única alteração em relação à Butyl Sepharose foi o gradiente de sal, que teve a concentração inicial ajustada para 2 M.

3.4.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

Sephadex G-25 - A resina Sephadex G-25, foi empacotada em coluna XK 26/50. Água deionizada foi empregada como fase móvel. O fluxo de trabalho foi de 10 ml/min e foram coletadas frações de 5 ml.

Sephacryl S-400 e Sephacryl S-300 - As resinas Sephacryl S-400 e Sephacryl S-300, foram empacotadas em colunas XK 16/100. A fase móvel, para cromatografias com ambas as resinas, foi solução de cloreto de sódio e fosfato de sódio (NaCl 150 mM; Na_2HPO_4 50 mM; pH 7,0). O fluxo de trabalho foi de 1 ml/min e dois esquemas de coleta foram adotados. No primeiro deles o volume das frações foi de 3 ml durante toda a cromatografia, já no segundo, as frações foram de 0,6 ml na região de eluição do conjugado e de 2,2 ml no restante da cromatografia.

Procedeu-se também a calibração da Sephacryl S-400 com Dextranas com pesos moleculares de 10, 40, 70, 229 e 2000 kDa, este último para determinação do volume morto. Esta calibração foi empregada para a determinação do peso molecular das populações de polissacarídeo nativo e hidrolisado.

3.5 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO PS1

3.5.1 Ensaios de Antigenicidade

A antigenicidade do PS1 foi avaliada por ensaios de ELISA de inibição (SENGUPTA et al., 2000; CHANG et al., 2013). Para tal, o soro anti-PS1 a ser empregado no ELISA foi previamente inibido pelo PS1 nas formas nativa e modificadas. Segue descrição da metodologia do ensaio.

Primeira etapa:

Inibição - O soro comercial anti-PS1 foi deixado para inibição, em microplaca, a 4°C, durante uma noite. Como agentes de inibição deste soro foram empregados PS1 nativo, PS1 hidrolisado, PS1 ligado ao espaçador e PS1 conjugado à proteína. As concentrações de polissacarídeo foram de 500 a 0,005 µg/ml.

O soro anti-PS1 foi empregado, para a inibição, a uma diluição de 1:10000. A solução empregada para diluição do soro foi composta de leite em pó desnatado 0,5% (m/v) em tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2).

Segunda etapa:

O soro inibido foi transferido para microplaca de fundo imunológico e realizado um ensaio de ELISA indireto (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Foram realizadas as etapas de sensibilização, bloqueio, incubação com soro comercial, incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação, conforme descrito abaixo:

Sensibilização - Microplacas de fundo imunológico Nunc MaxiSorp™ de 96 poços (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA), foram sensibilizadas com 100 µl de soluções do antígeno por poço, por uma noite, à 37 °C. As soluções de antígenos foram constituídas de PS1 nativo comercial a 50 µg/ml, em tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2). À sensibilização se seguiu a lavagem das placas com tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2) contendo Twenn 20 a 0,05% (v/v), por três vezes.

Bloqueio - As microplacas sensibilizadas e lavadas foram bloqueadas por 1 h à 37 °C, com 200 µl por poço de solução de bloqueio. Como solução de bloqueio foi utilizada tampão fosfato-salina pH 7,2 com 1% (m/v) de leite em pó desnatado. Após o bloqueio as placas foram lavadas como anteriormente, por três vezes.

Incubação com soro - As placas receberam o soro anti-PS1 previamente inibido sendo 100 µl o volume final em cada poço, para cada diluição. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1:30 h. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas, por três vezes.

Incubação com anticorpo secundário - As placas receberam 100 µl por poço de IgG anti-coelho conjugado à peroxidase, a uma diluição de 1:1000 e foram incubadas por 1:30 h à temperatura ambiente. A solução empregada para diluição do soro foi composta de leite em pó desnatado 0,5% (m/v) em tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2). Ao final da incubação, as placas foram por três vezes lavadas.

Revelação - Para revelação, as placas foram incubadas ao abrigo de luz durante 15 min com 100 µl, por poço, de solução 0,5 mg/ml de OPD (orto-fenildiamina) e 0,015% de H₂O₂ em tampão Citrato-Fosfato pH 5,0. A interrupção desta reação se deu por adição de 50 µl, por poço, de H₂SO₄ 4M e em seguida foram lidas as absorbâncias a 492 nm, em espectrofotômetro de placas Multiskan EX (Labsystems Uniscience, São Paulo, S.P., Brasil).

Para análise dos resultados, foram construídos gráficos da porcentagem de inibição em função da concentração do antígeno que atuou como inibidor. A porcentagem de inibição foi definida por **% Inibição = [1 - (Abs I / Abs SI)] x 100**, onde Abs I é a absorbância do soro que ficou incubado com uma determinada concentração do inibidor e Abs SI a absorbância do soro deixado sem inibidor (CHANG et al., 2012).

3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ¹H RMN para o PS1 hidrolisado (10 mg) solubilizado em água deuterada, foram adquiridos a 25 °C em equipamento Bruker Avance III (300 MHz).

3.5.3 Avaliação do PS1 por Dicroísmo Circular

Amostras do PS1 nativo, PS1 hidrolisado e PS1 ligado ao espaçador, na concentração de 1mg/ml, em água e a 25 °C, foram analisadas por dicroísmo circular em espectropolarímetro J-810 (Jasco), equipado com uma unidade Peltier e em cubetas com caminho óptico de 0,1 cm. Os espectros apresentados representam a média de cinco mensurações adquiridas para cada amostra. Os comprimentos de onda varridos foram de 183 a 300 nm, sendo a coleta de dados a cada 0,1 nm. Para cada amostra, os dados originalmente reportados em elipticidade, foram normalizados empregando-se, para esta normalização, a equação $(\theta - \theta_{\text{média}}) / \theta_{\text{dp}}$ onde θ é o valor de elipticidade para cada ponto e $\theta_{\text{média}}$ e θ_{dp} os valores da média das elipticidades e do desvio padrão desses valores, respectivamente. Esta normalização foi necessária uma vez que a determinação precisa das elipticidades molares não foi possível, provavelmente devido à polidispersão das populações analisadas.

Para avaliação da dinâmica de enovelamento do polissacarídeo, as amostras foram submetidas a variações de temperatura de 10 a 95 °C. A taxa das variações térmicas foi de 1 °C/min e a coleta de dados a cada 0,1 °C, a um comprimento de onda fixo (195 nm). Os dados foram reportados em elipticidade como função da temperatura e analisados por regressão linear para determinação dos valores de inclinação das retas.

3.6 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

3.6.1 Esquema de Imunização

Camundongos Balb/c, fêmeas, de idade entre 6 e 8 semanas e peso médio de 18 g, procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan, foram imunizados por via intraperitoneal com doses de 0,5 ml. As doses foram administradas com intervalos de 14 dias totalizando 3 imunizações. Os animais foram sangrados no 13º dia após a terceira imunização por via retro orbital.

Cada grupo de 5 animais recebeu doses constituídas de solução salina, PS1 e PspA co-administrados e PS1 e PspA conjugados.

3.6.2 Preparação dos Soros

O sangue proveniente de cada animal foi mantido à 4 °C por uma noite e em seguida centrifugado a 2000 rpm, durante 20 min, à 4 °C, para separação do soro.

3.6.3 Determinação de Títulos

Para a avaliação da produção de anticorpos - IgG anti-PS1 e IgG anti-PspA - decorrentes das imunizações, os soros obtidos na etapa descrita anteriormente foram empregados em ensaios de ELISA indireto (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Foram realizadas as etapas de sensibilização, bloqueio, incubação com soro proveniente dos animais imunizados, incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação, conforme descrito abaixo.

Sensibilização - Microplacas de fundo imunológico Nunc MaxiSorp™ de 96 poços (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA), foram sensibilizadas com 100 µl de soluções do antígeno, por poço, por uma noite, à 37 °C no caso do PS1 e a 4 °C no caso da PspA. As soluções de antígenos foram constituídas de PS1 nativo a 50 µg/ml ou PspA nativa a 1 µg/ml, em tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2). À sensibilização se seguiu a lavagem das placas com tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2) contendo Tween 20 a 0,05% (v/v), por três vezes.

Bloqueio - As microplacas sensibilizadas e lavadas foram bloqueadas por 1 h à 37 °C, com 200 µl por poço de solução de bloqueio. Como solução de bloqueio foi utilizada tampão fosfato-salina pH 7,2 com 1% (m/v) de leite em pó desnatado. Após o bloqueio as placas foram lavadas como anteriormente, por três vezes.

Incubação com soro dos animais - As placas receberam o soro dos animais imunizados seguindo-se esquema de diluição seriada, sendo o volume final em cada poço e para cada diluição, de 100 µl. A diluição dos soros foi em tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2) com 0,5% (m/v) de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1:30 h. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas, por três vezes.

Incubação com anticorpo secundário - As placas receberam 100 µl, por poço, de IgG anti-camundongo conjugado à peroxidase, a uma diluição de 1:1000 e foram incubadas por 1:30 h à temperatura ambiente. A solução empregada para diluição do soro foi composta de leite em pó desnatado 0,5% (m/v) em tampão fosfato-salina (PBS pH 7,2). Ao final da incubação, as placas foram por três vezes lavadas.

Revelação - Para revelação, as placas foram incubadas ao abrigo de luz durante 15 min com 100 µl, por poço, de solução 0,5 mg/ml de OPD (orto-fenildiamina) e 0,015% de H₂O₂ em tampão Citrato-Fosfato pH 5,0. A interrupção desta reação se deu por adição de 50 µl, por poço, de H₂SO₄ 4M e em seguida foram lidas as absorbâncias a 492 nm, em espectrofotômetro de placas Multiskan EX (Labsystems Uniscience, São Paulo, S.P., Brasil).

Os valores de títulos de IgG foram determinados pela construção de um gráfico dos valores de absorbâncias em função do logaritmo das diluições dos soros dos animais. Tomando-se a região linear dessas curvas e trabalhando por meio de regressão linear, os valores de título puderam ser calculados adotando-se como referência o valor de 0,1 para a absorbância.

As análises estatística, para verificação de diferenças significativas entre os títulos de IgG dos diferentes grupos, foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6. O teste estatístico aplicado foi o t-test, com nível de significância $p < 0,05$.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Métodos colorimétricos foram empregados para a quantificação de polissacarídeo e de proteína bem como para a quantificação da introdução de moléculas de ADH e do nível de modificação da PspA.

3.7.1 Método Fenol-Sulfúrico

O método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi empregado para a quantificação do PS1. Para isso, foram tomadas amostras de 200 µl às quais foram adicionados 200 µl de C₆H₅OH 5% (m/v) e 1 ml de H₂SO₄ concentrado. Para a adição do ácido, as amostras foram mantidas em banho de gelo, onde

permaneceram por 10 min. Em seguida foram homogeneizadas por vortex, transferidas para banho à 80 °C e deixadas por 30 min. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e mantidas em temperatura ambiente por cerca de 20 min. As absorbâncias foram lidas em seguida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 490 nm.

Como padrão para construção da curva de calibração foi utilizado o PS1 comercial (ATCC).

3.7.2 Método TNBS

Para determinar a quantidade de moléculas de ADH que foram inseridas quimicamente no PS1-AH, conseqüentemente o número de grupos NH_2 introduzidos, foi empregado o método do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico ou método TNBS (Qi et al., 1988), que apresenta especificidade para detecção de grupos amino primários.

Amostras de 50 μl foram distribuídas em poços de microplaca e a elas adicionados 50 μl de tampão borato de sódio 200 mM a pH 8,5 e 50 μl de TNBS 1%. A placa foi incubada por 40 min a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a incubação, foram adicionados às amostras 100 μl de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 100 mM pH 10,8.

As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 492 nm.

Como padrão para construção da curva de calibração foi utilizado o ADH.

3.7.3 Método BCA

Para quantificação de proteínas foi adotado o método do Ácido Bicinchonínico (BCA) (TYLLIANAKIS et al., 1994).

Amostras de 25 μl foram distribuídas em poços de microplaca e a elas adicionados 200 μl do reagente de BCA. Deixou-se reagir por 30 min à temperatura de 37 °C. Após a placa atingir temperatura ambiente as absorbâncias foram lidas a 592 nm, em espectrofotômetro de placas.

Como padrão para construção da curva de calibração foi utilizada albumina bovina (BSA).

3.7.4 Eletroforese (SDS-PAGE)

Foram realizadas eletroforeses em sistema vertical (Sistema Electrophoresis Power Supply EPS 301 - GE Healthcare Bio-Sciences). A visualização de proteínas se deu por coloração com Coomassie Blue.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO

Visando à síntese do conjugado PS1-PspA, três diferentes métodos foram empregados. Em todos esses métodos estiveram envolvidas as etapas de modificações do PS1 e uma modificação da PspA, que só não foi empregada no método de aminação redutiva.

Tais métodos, já citados na Introdução, foram os seguintes:

- Método de conjugação com DMT-MM como agente ativador e ADH como espaçador
- Método de conjugação com DMT-MM como agente ativador e na ausência de espaçador
- Método de conjugação por aminação redutiva

Dentre estes métodos, o único que resultou na obtenção do conjugado foi o método de conjugação com DMT-MM, como agente ativador, e na presença de espaçador. Os resultados obtidos para este método serão descritos a seguir.

4.1.1 Método de Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador e ADH como Espaçador

Como já foi referido, em nosso laboratório vem sendo empregado um método de conjugação no qual o DMT-MM atua como agente ativador das carboxilas da proteína, tornando viável a ligação desses grupos aos grupos amina, introduzidos nos polissacarídeos pela ligação desses à molécula espaçadora (ADH).

No entanto, devido às particularidades da estrutura do PS1, este método passou ainda por algumas adaptações do protocolo, com etapas reacionais distintas dos demais trabalhos do grupo, sendo mantida a função do DMT-MM na ativação da proteína e o ADH como molécula espaçadora.

4.1.1.1 Modificações do PS1

Para a conjugação do PS1 à PspA, o polissacarídeo foi submetido a etapas reacionais que, no caso deste método, foram a fragmentação por hidrólise ácida e a introdução de uma molécula que atuou como espaçadora.

4.1.1.1.1 Hidrólise do PS1

Como foi mencionado na Introdução, a fragmentação pode favorecer o trabalho com polissacarídeos.

As soluções com a forma nativa do PS1 apresentaram grande viscosidade o que poderia acarretar a formação de gel, uma condição desfavorável para reações de conjugação. A fim de reduzir a viscosidade das soluções de polissacarídeo a serem empregadas neste trabalho, tornando mais viável a obtenção de um conjugado, o polissacarídeo foi fragmentado por hidrólise ácida. Isso por serem as ligações glicosídicas de polissacarídeos suscetíveis à ruptura em meio ácido, como já foi mencionado. Na Figura 5, são mostradas as ligações passíveis de ruptura com a hidrólise ácida do PS1.

Figura 5 - Ilustração da unidade de repetição do PS1, sendo indicadas as ligações glicosídicas que podem ser rompidas com a hidrólise ácida.

Considerando que o comprimento ideal de uma cadeia polissacarídica constituinte de uma vacina conjugada não é um parâmetro definido, podendo variar para cada polissacarídeo (DAUM et al., 1997), o que se objetivou com a hidrólise do PS1 foi a obtenção de fragmentos com pesos moleculares em uma faixa de 20 a 50 kDa, correspondendo a aproximadamente 40 e 100 unidades de repetição, respectivamente. Esses valores de pesos moleculares já foram empregados em trabalhos do grupo com o PS6B e o PS14 (PERCIANI et al, 2013; SANTAMARIA et al., 2011).

Estabelecimento das condições de hidrólise – Estabelecer as condições de hidrólise do PS1 foi importante para garantir a reprodutibilidade de todas as etapas do método de conjugação proposto. Além disso, sabe-se que conjugados com pesos moleculares definidos são desejáveis, uma vez que a variação do peso molecular do polissacarídeo pode levar a variações de propriedades físico-químicas bem como imunológicas do conjugado obtido (WANG et al., 2003).

As condições de partida para a hidrólise do PS1 foram adotadas com base em estudos anteriores do grupo (PERCIANI, et al., 2014; SANTAMARIA, et al., 2011). Após os primeiros testes já se notou que a estrutura do sorotipo 1 o torna mais resistente à hidrólise ácida, o que exigiria condições mais drásticas em comparação ao que já tem sido feito em nosso laboratório, para outros sorotipos. Essa maior resistência do PS1 à hidrólise ácida parece estar relacionada à presença de ácidos urônicos na estrutura desse polissacarídeo (JHON, 2005; MOREAU; TALAGA; VIALLE, 2002). Dentre os três sorotipos estudados em nosso laboratório, o PS1 é o único a apresentar uma estrutura com ácidos urônicos, o que pode ser observado ao comparar a sua estrutura com as estruturas das unidades de repetição do PS14 e do PS6B, esquematizadas na Figura 6, o que reforça a ideia de que este aspecto da estrutura é responsável pela sua maior resistência à hidrólise ácida.

As condições de hidrólise dos polissacarídeos sorotipos 14 e 6B (PERCIANI et al., 2011; SANTAMARIA et al., 2011) são mostradas na Tabela 2.

Figura 6 - Ilustração das unidades de repetição dos polissacarídeos PS14 e PS6B.

Tabela 2 - Condições de hidrólise para PS14 e PS6B.

Sorotipo	Parâmetros da hidrólise	
	Concentração de HCl	Tempo de reação
14	0,5 M	30 min
6B	0,5 M	1 h

A primeira modificação em relação aos trabalhos anteriores foi o aumento da concentração do ácido clorídrico no meio reacional, de 0,5 M para 1M. Quanto ao tempo de reação, que nos trabalhos anteriores chegou a um máximo de 1 h (PERCIANI et al., 2013; SANTAMARIA et al., 2011), no caso do PS1 foram necessárias várias investidas para que fosse definido.

Teste por Hidrólises Consecutivas

Nas primeiras condições adotadas, só foi possível obter uma população do PS1 fragmentado com um peso molecular na faixa desejada após duas hidrólises consecutivas. O PS1, após ser submetido a 7 h de hidrólise, apresentou peso molecular médio de 128 kDa, valor este bem acima da faixa desejada. O produto da reação foi purificado e concentrado para ser submetido a uma segunda hidrólise, com o objetivo de dar seqüência à fragmentação.

Para a segunda hidrólise, foram testados os tempos de reação de 2 h, 5 h e 6 h, tendo sido este último tempo o adotado.

A segunda hidrólise foi realizada por 6 h. Após a reação, o PS1 apresentou um peso molecular médio de 19 kDa. Embora fosse este um valor de peso molecular aceitável para o polissacarídeo fragmentado, este protocolo implicou em grande perda de massa de polissacarídeo, uma vez que o procedimento se realizou em duas etapas logo, as perdas relacionadas aos dois processos se somaram. Provavelmente o fator mais significativo para tais perdas foi a purificação do produto da primeira hidrólise, realizada por cromatografia em resina Sephadex G-25, processo para o qual a recuperação máxima observada em nosso laboratório não ultrapassa 80%. Além disso, este protocolo não se mostrou reproduzível e, por esta razão, outros testes foram realizados para se estabelecer uma condição de hidrólise do PS1.

Teste de Hidrólise Ininterrupta

Buscou-se uma alternativa para que a hidrólise do PS1 pudesse ser conduzida de forma ininterrupta, eliminando-se as etapas consecutivas de hidrólise, visando à redução na perda de massa de polissacarídeo.

A hidrólise foi realizada em um sistema no qual alíquotas da reação pudessem ser retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, sem interrupção da reação. Essas alíquotas permitiram a avaliação do peso molecular médio da população do PS1 ao longo do processo de hidrólise.

Quando se verificou o valor de peso molecular requerido, o intervalo de tempo correspondente foi o adotado para o protocolo de hidrólise. No entanto, os

resultados não se reproduziram nessas condições e uma possibilidade a ser considerada seria a não homogeneidade do meio reacional.

Teste em Menor Escala

Diante dos resultados dos dois testes anteriores, foram realizados testes com volumes de reação fixos, isto é, sem retirada de alíquotas. Foram executadas hidrólises com tempos de reação de 8:30 h e de 10 h, tempos estes estabelecidos com base nos testes anteriores – teste por hidrólises consecutivas e teste de hidrólise ininterrupta.

Os volumes de reação foram de 5 ou 10 ml e a concentração de PS1, em todos os casos, foi de 5 mg/ml. A Figura 7 mostra os cromatogramas dos produtos dessas hidrólises.

Os volumes nos quais a média destas populações eluíram (volumes de eluição) foram empregados na determinação dos pesos moleculares. As populações geradas por estas hidrólises apresentaram fragmentos médios de 36 e 5,6 kDa, para os tempos de 8:30 h e 10 h, respectivamente.

Figura 7 - Cromatogramas dos produtos das hidrólises do PS1, em resina Sephacryl S-400, para 8:30 h e para 10 h de reação. O volume das reações foi de 5 ml.

Na Figura 8, são mostrados os cromatogramas dos produtos das hidrólises de 5 e de 10 ml, quando o tempo de reação foi fixado em 8:30 h. O peso molecular

médio dos fragmentos do PS1, após a hidrólise com volume de 10 ml, foi de 120 kDa enquanto o observado para o volume de 5 ml foi 36 kDa, sugerindo que o aumento de volume do meio reacional interfere no processo, dificultando a fragmentação.

Como as concentrações do polissacarídeo (PS1 5 mg/ml) e do ácido (HCl 1M) foram as mesmas nas hidrólises de 5 e de 10 ml de reação, o resultado divergente não seria esperado. Entretanto, condições operacionais – tais como agitação ineficiente para manter a homogeneidade de um sistema de maior volume, má distribuição de calor na solução, instabilidade do aquecimento do sistema - podem ter sido responsáveis pelo resultado observado.

Figura 8 - Cromatogramas, em resina Sephacryl S-400, do PS1 após hidrólise por 8:30 h, com volumes de reação de 5 e 10 ml.

A variação de peso molecular médio do PS1 hidrolisado, decorrente do aumento do volume de reação, também foi observada para as hidrólises de 10 h. O peso molecular médio da população após 10 h de hidrólise, com volume de reação de 10 ml, foi de 68 kDa. Na Figura 9 são mostrados os cromatogramas dos produtos das hidrólises com tempo fixado em 10 h e volumes de 5 e 10 ml. Esses cromatogramas permitiram visualizar a diferença no perfil de eluição destas populações e foram a base para os cálculos dos pesos moleculares. Os resultados para as quatro condições testadas são resumidos na Tabela 3.

Figura 9 - Cromatogramas do PS1 hidrolisado durante 10 h com 5 ml e 10 ml de volume de reação.

Tabela 3 - Pesos moleculares médios dos produtos de hidrólises de 8:30 h e de 10 h, para volumes de reação de 5 e de 10 ml.

Tempo de Reação	Volume de Reação	
	5 ml	10 ml
8:30 h	36 kDa	120 kDa
10 h	5,6 kDa	68 kDa

Com estes resultados pode-se observar que o peso molecular médio varia inversamente com o tempo de hidrólise, resultado já esperado. Contudo, não era esperado que a variação do volume do meio reacional conduzisse a uma redução do grau de fragmentação do polissacarídeo, quando mantidos o tempo de hidrólise e as condições do meio reacional. Como já foi mencionado, é possível que isso tenha sido acarretado por condições operacionais desfavoráveis.

No conjunto de dados mostrado na Tabela 3, o valor de 36 kDa seria aceitável para o trabalho. No entanto, como esta condição não pode ser aplicada a volumes de reações maiores não foi possível utilizá-la, pois não supriria a massa de polissacarídeo necessária para desenvolver as etapas do processo de conjugação.

Os esquemas mostrados na Figura 10 resumem os três testes empregados com o objetivo de estabelecer as condições de hidrólise do PS1.

Figura 10 - Esquema ilustrando os testes de hidrólise para o PS1.

Em todos os casos de hidrólises testados, foi notória a dificuldade de reproduzir o resultado. Esta dificuldade só foi contornada mediante um protocolo no qual foram fixados os seguintes parâmetros: concentração (m/v) do PS1 (5 mg/ml), concentração molar do ácido clorídrico (1M HCl), volume de reação (20 ml) e tempo de reação (8 h). Somente nestas condições foi possível obter, a cada hidrólise diferente, o PS1 hidrolisado com valores de peso molecular médio dentro de uma mesma faixa, considerada adequada para dar prosseguimento às demais etapas. A

Figura 11 ilustra como este protocolo se mostrou mais reprodutível em relação aos demais, apresentando os cromatogramas de amostras dos produtos de quatro diferentes hidrólises do PS1, realizadas nas mesmas condições. Como se pode notar, os produtos das quatro reações apresentaram perfis semelhantes.

Um inconveniente da aplicação deste protocolo foi a limitação da massa inicial de polissacarídeo na reação (100 mg), o que exigiu reunir os produtos de mais de uma hidrólise para que se obtivesse massa de PS1 suficiente para prosseguimento das etapas envolvidas no processo de conjugação.

Figura 11 - Cromatogramas dos produtos de quatro diferentes hidrólises, realizadas sob as mesmas condições.

Um fator que contribuiu para a dificuldade em reproduzir os resultados das hidrólises, quanto aos pesos moleculares, foi a utilização do PS1 proveniente de diferentes cultivos do pneumococo. Isso porque as condições de cultivo das bactérias influenciam na síntese do polissacarídeo capsular bacteriano, podendo o peso molecular médio da população do polissacarídeo nativo variar a cada cultivo (MASSALDI et al., 2010). No caso da Figura 11, as quatro reações que mostraram a reprodutibilidade do protocolo foram realizadas com o PS1 nativo oriundo de um mesmo cultivo. O uso do PS1 proveniente de diferentes cultivos foi devido ao fato de que o Laboratório de Bioprocessos vem trabalhando na otimização das condições de cultivo e purificação desse polissacarídeo.

Fragmentação por hidrólise ácida – O PS1 foi submetido à hidrólise seguindo-se o protocolo estabelecido anteriormente, no qual foram fixados a concentração do PS1, a concentração do ácido, o volume e o tempo de reação.

A etapa de hidrólise, incluindo a purificação, apresentou rendimento em torno de 50%. O baixo rendimento desta etapa esteve relacionado à polidispersão do PS1 nativo que, quando hidrolisado, gerou fragmentos de pesos moleculares muito variados. Com esta grande variação, uma parte da população esteve fora da faixa desejada (20-50 kDa) e foi necessária sua separação. No cromatograma da purificação do PS1 hidrolisado, mostrado na Figura 12, pode ser verificada esta população de peso molecular inferior ao desejado. Esta etapa de purificação também possibilitou a separação desta população.

Figura 12 - Cromatograma da purificação do PS1 hidrolisado, em resina Sephadex G-25. A população separada aparece circulada no cromatograma.

Uma menor polidispersão da população do PS1 nativo poderia conduzir a duas vantagens: 1) uma melhor avaliação do protocolo de hidrólise empregado, garantindo que os baixos rendimentos verificados não estiveram relacionados ao processo em si. Logo, alterações da metodologia não seriam suficientes para promover uma melhoria neste aspecto de rendimento; 2) reduzir a possibilidade de variações das propriedades físico-químicas entre as moléculas de polissacarídeo, que ocorrem se a população de PS1 apresenta grandes variações de peso molecular.

Com base nisso, alternativas foram adotadas na busca de obter uma população do PS1 com menor polidispersão. Com esse intuito foram aplicadas técnicas que permitissem a separação de moléculas de acordo com o peso molecular. As técnicas de filtração tangencial e de cromatografia por exclusão molecular foram as empregadas, no entanto, por limitações metodológicas o objetivo não foi atingido. Diante disso, o desenvolvimento do presente trabalho se deu com o PS1 nativo como nos foi fornecido pelo Laboratório de Bioprocessos e com alto grau de polidispersão.

A Figura 13 mostra um dos cromatogramas do PS1 nativo e do PS1 hidrolisado ilustrando, através da diferença entre os perfis de eluição, que a fragmentação do polissacarídeo efetivamente ocorreu. Neste cromatograma também foi verificada a presença de uma única população de PS1 hidrolisado, o que permite concluir que a separação da população de peso molecular abaixo do desejado, mostrada na Figura 12, foi eficaz.

Os cromatogramas dos produtos das hidrólises, semelhantes ao da Figura 13, forneceram os dados de volumes de eluição para determinação dos pesos moleculares das populações de polissacarídeo.

Com as hidrólises, o PS1 nativo, cujo peso molecular médio era de 1000 kDa, foi reduzido a fragmentos que apresentaram pesos moleculares médios entre 15 e 45 kDa.

Figura 13 - Perfil cromatográfico, em resina Sephacryl S-400, do PS1 nativo e do hidrolisado, após a purificação.

4.1.1.1.2 Introdução da Molécula Espaçadora

O método de conjugação empregado envolveu uma etapa para a introdução de moléculas espaçadoras na estrutura do PS1. Um dos aspectos mais imediatos que levaram à escolha de um método de conjugação em presença de um espaçador foi a constituição do PS1 e a estrutura tridimensional a ele atribuída (CHOI, et al., 2002).

Estudos sugerem que o PS1 possui uma conformação helicoidal, conferida pelo grau de estruturação, que tem sido pensado ser mais elevado em polissacarídeos possuidores de cargas positivas e negativas, como o PS1 (CHOI, et al., 2002). Logo, a presença de uma molécula espaçadora pode ter sido importante para favorecer o acoplamento entre polissacarídeo e proteína. Também por esta razão optou-se pela ligação do espaçador ao polissacarídeo e não à proteína.

Como molécula espaçadora, empregou-se a dihidrazida do ácido adipico (ADH), uma molécula que apresenta um grupo hidrazida (NH-NH_2) em cada uma das extremidades de sua cadeia de 6 átomos de carbono. O uso do ADH como espaçador na síntese de conjugados tem se mostrado bastante satisfatório (BYRD; KADIST, 1992; LINDBERG, 1999).

Para a introdução do espaçador, características estruturais do PS1 foram exploradas. A presença de grupos já reativos permitiu a eliminação de uma etapa reacional, representando uma vantagem do ponto de vista do rendimento global do processo de obtenção do conjugado. No caso do PS1, carboxilas de sua estrutura foram recrutadas nesta reação. Para polissacarídeos que não possuam grupos carboxílicos, é necessária a oxidação antes da reação com o espaçador, como já foi mencionado na descrição dos métodos de conjugação.

A ligação do PS1 com a molécula espaçadora se processa pela reação entre um dos grupos amina do ADH e os grupos carboxílicos do PS1, ativados pelo DMT-MM, ocorrendo a formação de uma carboxamida entre polissacarídeo e espaçador. As estruturas A e B, representadas na Figura 14, correspondem respectivamente ao PS1, com os grupos carboxílicos reativos realçados em vermelho, e à molécula da dihidrazida do ácido adípico (ADH), cujos grupos hidrazida são destacados em verde.

Figura 14 - Representação esquemática (A) da unidade de repetição do PS1, com seus grupos carboxila em destaque e (B) de uma molécula da dihidrazida do ácido adípico, com seus grupos hidrazida destacados em verde.

O esquema da reação entre o PS1 e o ADH, tendo o DMT-MM como ativador das carboxilas, é mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Representação da reação entre PS1 e ADH.

Após a purificação do produto da reação entre PS1 hidrolisado e ADH (PS1-AH), procedeu-se à quantificação dos grupos amina livres (NH_2) que foram introduzidos na estrutura do polissacarídeo pela inserção do ADH. Os resultados indicaram que moléculas de ADH foram efetivamente introduzidas na estrutura do PS1, e os valores apresentados encontram-se entre 4 e 8 moles de ADH por mol de PS1, o que corresponde a uma introdução de aproximadamente 4 a 8 grupos amina

por molécula de PS1. Para o rendimento desta etapa, incluindo o processo de purificação, foram encontrados valores entre 70 e 75%.

4.1.1.2 Modificação da PspA

Trabalhos do grupo conduziram à hipótese de que ocorria polimerização da PspA no meio reacional, durante o processo de conjugação, o que representaria um fator desfavorável para a obtenção de um conjugado (SANTAMARIA, 2011).

Considerando que a polimerização resulta da ligação entre um grupo carboxila de uma molécula protéica e um grupo amina de uma segunda molécula, e sendo a PspA uma proteína com resíduos de lisina, majoritariamente responsáveis pela presença dos grupos amina de sua estrutura, a alternativa foi adotar um protocolo de modificação da PspA, nesses resíduos. Tal modificação consiste em uma reação de proteção, por N-alquilação, dos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina da PspA (SANTAMARIA, 2011). A Figura 16 apresenta o esquema da reação de proteção dos grupos ϵ -amino das lisinas da PspA.

Figura 16 - Esquema da reação empregada para modificação da PspA.

O grau de modificação foi avaliado, e, neste caso, a modificação atingiu aproximadamente 98%.

4.1.1.3 Reação de Conjugação

PS1-AH e PspA modificada (PspA1mod) reagiram durante 24 h. A relação entre as massas da proteína e do polissacarídeo foi 2:1 e o produto da reação foi analisado por cromatografia para verificação da formação do conjugado.

4.1.1.4 Cromatografia por Interação Hidrofóbica

O produto da reação de conjugação foi analisado pela técnica de cromatografia por interação hidrofóbica, que foi a técnica estabelecida, em nosso laboratório, tanto para verificar se houve formação do conjugado como para a purificação do mesmo.

Na cromatografia por interação hidrofóbica, mesmo em elevadas concentrações de sais, não ocorre interação entre o polissacarídeo – molécula de caráter mais hidrofílico - e a resina. Já no caso das proteínas, ocorrem interações hidrofóbicas entre a matriz e regiões não polares na superfície dessas moléculas, sendo a adsorção aumentada com elevadas concentrações de sal na fase móvel, enquanto o decréscimo das concentrações salinas resulta na eluição das proteínas (CABRAL; QUEIROZ; TOMAZ, 2001; FAUSNAUGH et al., 1984). Para o conjugado, espera-se que a interação com a resina apresente intensidade intermediária entre o que é observado para polissacarídeo e proteína, uma vez que é esperado que apresente hidrofobicidade intermediária em relação a seus componentes. Os diferentes comportamentos de hidrofobicidade de polissacarídeo, proteína e conjugado quando em soluções salinas, é o que permite a separação dessas moléculas pela cromatografia por interação hidrofóbica, realizada com gradiente decrescente de sal.

Um passo importante nesta etapa do trabalho foi a escolha, dentre as resinas disponíveis no laboratório, da mais adequada para a purificação do conjugado PS1-PspA.

Dadas as considerações anteriores sobre a eluição de polissacarídeo e proteína fica claro que para garantir uma purificação satisfatória do conjugado por meio desta técnica cromatográfica, o ideal seria uma eluição da proteína mais ao final da cromatografia, permitindo a melhor separação entre os elementos livres e conjugados.

Para a escolha da resina foi importante levar em conta a natureza dos ligantes constituintes da matriz. Considerando as resinas disponíveis em nosso laboratório - Octyl Sepharose, Butyl Sepharose e Phenyl Sepharose – a melhor das opções seria a Phenyl Sepharose, devido à presença dos grupos aromáticos em sua matriz. Estes grupos promovem uma maior interação da proteína com a resina (CABRAL; QUEIROZ; TOMAZ, 2001), levando a uma eluição da PspA mais ao final

da cromatografia, o que, como já vimos, permite uma melhor separação entre elementos livres e conjugados.

Embora fosse possível prever a melhor das opções, um ensaio foi realizado para verificar, na prática, o perfil de eluição da proteína modificada nas resinas mencionadas.

A PspA1mod foi inicialmente analisada em resina Butyl Sepharose, e o cromatograma resultante, que é mostrado na Figura 17, permitiu visualizar que a eluição da proteína se iniciou em um volume próximo a 50 ml. Como já foi abordado, o que se buscou foi uma condição na qual a eluição da proteína ocorresse mais ao final do processo cromatográfico, o que nesse caso se deu em 250 ml. Diante deste resultado, procedeu-se a análise do perfil de eluição da PspA1mod nas resinas Octyl Sepharose e Phenyl Sepharose.

Figura 17 - Perfil de eluição da PspA1mod na resina Butyl sepharose.

Para a Butyl sepharose, o gradiente de sal foi de 1 M para 0 M, enquanto para Octyl e Phenyl sepharose a concentração inicial do sulfato de amônio já foi ajustada para 2 M, na tentativa de favorecer as interações entre proteína e ligantes da resina.

A Figura 18, mostra os perfis cromatográficos da PspA1mod nas resinas Octyl sepharose e Phenyl sepharose. Em ambos os casos, o volume de eluição da proteína foi posterior ao observado para a cromatografia em Butyl sepharose, iniciando-se a eluição da PspA1mod em aproximadamente 125 ml, no caso da Octyl

sepharose, e em 150 ml para a Phenyl sepharose. Conforme esperado, a presença de grupos aromáticos em sua matriz, fez com que a Phenyl sepharose possibilitasse a eluição da proteína mais ao fim do gradiente e, por esta razão, foi a resina adotada para purificar o conjugado.

Figura 18 - Perfil de eluição da PspA1mod nas resinas Octyl sepharose e Phenyl sepharose.

Feita a escolha da resina, o produto da reação entre PS1-AH e PspA1mod foi analisado em resina Phenyl sepharose, tendo os perfis cromatográficos de PS1-AH e PspA1mod como referência para avaliar a região de eluição de um possível conjugado. Na Figura 19 são mostrados os resultados para esta análise, e a presença de regiões nas quais se nota a eluição de polissacarídeo e proteína, nos mesmos volumes, indica a formação do conjugado.

Contudo, ainda que o conjugado tenha sido formado, a purificação do mesmo não foi eficiente. Os resultados mostrados na Figura 19, sugerem que a hidrofobicidade do conjugado obtido não foi suficientemente diferente da hidrofobicidade de PS1-AH e PspA1mod, impossibilitando a aplicação da cromatografia de interação hidrofóbica na purificação do conjugado PS1-PspA. Esses mesmos resultados mostram que é possível que haja duas populações de conjugado cujas características hidrofóbicas são distintas, já que se vê a sobreposição de regiões de eluição de polissacarídeo e proteína em dois pontos –

um ao início do cromatograma, região na qual só era esperado eluir o polissacarídeo livre, e um ao final, onde só eluiria a proteína livre.

Figura 19 - Cromatograma da purificação da conjugação PS1- PspA em resina Phenyl sepharose.

Como visto, os resultados acima sugerem que a conjugação entre PS1 e PspA se estabeleceu, não sendo necessárias alterações no protocolo de obtenção. Sendo assim, as próximas investidas do presente trabalho envolveram melhorias nas condições de purificação do conjugado.

4.1.1.5 Cromatografia por Exclusão Molecular

A cromatografia por exclusão molecular foi pensada como alternativa para a purificação do conjugado PS1-PspA, por se tratar de uma técnica que promove a separação de moléculas com diferentes pesos moleculares. O que permitiu a aplicação desta técnica foi o fato de o peso molecular do conjugado ser maior que o dos elementos não conjugados – polissacarídeo e proteína livres.

A escolha da resina empregada para a purificação do conjugado PS1-PspA por cromatografia de exclusão molecular, exigiu menos análises do que as requeridas para o caso da interação hidrofóbica, uma vez que esta técnica – exclusão molecular – não envolve interações entre as moléculas e a resina. Após alguns testes para otimizar as condições de purificação, um novo conjugado foi sintetizado para análise por cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400.

Este conjugado foi obtido de acordo com o protocolo anteriormente usado, alterando-se, contudo, de 2:1 para 1:1 a relação entre as massas de proteína e polissacarídeo. Esta alteração foi realizada por não ter sido observada qualquer vantagem, no que se refere à obtenção do conjugado, relacionada a esse excesso de proteína na reação. Assim sendo, tal excesso representaria apenas uma dificuldade adicional para a etapa de purificação.

O conjugado então obtido foi avaliado por cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 20. Assim como na análise por interação hidrofóbica, os perfis cromatográficos do PS1-AH e da PspA3mod serviram como referência para avaliação da região de eluição do conjugado PS1-PspA.

A presença de uma população eluída em volume anterior aos volumes de eluição do PS1-AH e da PspA3mod atestaram a formação do conjugado. No entanto, a purificação deste não foi satisfatória, uma vez que não houve uma nítida separação entre as populações de conjugado e de elementos não conjugados (PS1-AH e PspA3mod). A fim de respaldar os resultados, quanto à formação do conjugado, as frações coletadas durante a cromatografia e que corresponderiam ao conjugado PS1-PspA, foram reunidas e uma amostra foi analisada por eletroforese (SDS-PAGE). A região de eluição do conjugado e o resultado da eletroforese estão reunidos na Figura 20.

A análise da amostra do conjugado por eletroforese, corada para proteínas, revelou a presença de uma banda protéica cuja migração no gel foi muito inferior à migração da PspA3mod, indicando ser a proteína conjugada ao polissacarídeo. Este resultado foi coerente com o mostrado pela cromatografia por exclusão molecular.

Figura 20 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1-PspA por cromatografia por exclusão molecular em resina Sephacryl S-400 e resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para verificação do conjugado PS1 – PspA. O gel foi corado para proteína (Coomassie).

Na busca de uma melhor separação entre as populações de conjugado e de elementos não conjugados (PS1-AH e PspA3mod), um esquema de coleta de frações alternativo ao do primeiro caso foi realizado. Este esquema envolveu a ampliação do número de frações coletadas na região de eluição do conjugado e o resultado é mostrado na Figura 21, na qual se vê que, ainda nesta condição, não foi possível uma purificação satisfatória do conjugado obtido.

Figura 21 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1 – PspA em resina Sephacryl S-400 no qual houve uma ampliação do número de frações coletadas na região de eluição do conjugado, com frações de 0,6 ml nessa região e 2,2 ml após a eluição do conjugado.

Buscando-se ainda a melhoria do processo de purificação do conjugado PS1-PspA – ou seja, uma melhor separação entre este e proteína e polissacarídeo que não conjugaram – a resina Sephacryl S-300 foi empregada. Essa resina, quando comparada à S-400, apresenta uma faixa mais estreita de limites de exclusão, o que favorece a resolução da cromatografia.

A análise do conjugado PS1-PspA na S-300, mostrou uma nítida separação entre populações de elementos livres e conjugados. O cromatograma desta purificação se encontra na Figura 22.

De modo semelhante ao realizado para a S-400, foi adotado um esquema de coleta com ampliação das frações coletadas na região de eluição do conjugado, permitindo uma melhor separação entre este e PS1-AH e PspA3mod, tendo sido assim estabelecido o protocolo de purificação para esta conjugação. O cromatograma dessa purificação é mostrado na Figura 23.

Figura 22 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1-PspA em resina Sephadryl S-300. Esquema de coleta de frações de 3 ml. A população que corresponde ao conjugado PS1-PspA é indicado na figura.

Figura 23 - Cromatograma da purificação do conjugado PS1-PspA em resina Sephadryl S-300. As frações coletadas na região de eluição do conjugado foram de 0,6 ml e 2,2 ml após eluição do conjugado.

Uma vez purificado o conjugado PS1-PspA, foi possível determinar a relação entre as massas de proteína e polissacarídeo que foi de 1:1,7. O rendimento da etapa de conjugação esteve em torno de 30% enquanto o rendimento global do processo de obtenção do conjugado foi de 10%. Esses rendimentos foram calculados com base na massa inicial de polissacarídeo, em cada etapa.

4.1.2 Método de Conjugação com DMT-MM como Agente Ativador na

Ausência de Espaçador

A presente estratégia de conjugação baseou-se no método empregado anteriormente, tendo como diferença a ausência da ligação do PS1 ao espaçador. Este método alternativo para a obtenção do conjugado PS1-PspA levou em conta o fato de o PS1 já possuir grupos amina em sua estrutura. Desse modo, os grupos amina presentes na estrutura do PS1 é que seriam os envolvidos na conjugação, e não os grupos amina disponíveis na estrutura do polissacarídeo a partir da introdução do espaçador.

A vantagem de se obter o conjugado por esta metodologia estaria relacionada à eliminação de uma etapa reacional – introdução da molécula espaçadora – o que poderia acarretar aumento do rendimento global do processo. Uma segunda possibilidade seria que, a eliminação de uma das etapas reacionais acarretasse alguma vantagem do ponto de vista imunológica, uma vez que o polissacarídeo seria menos modificado ao longo do processo de conjugação, reduzindo assim a possibilidade de comprometimento de epítomos do polissacarídeo.

4.1.2.1 Reação de Conjugação

O PS1 hidrolisado (PS1hid) e a PspA3 modificada (PspA3mod) – obtidos como descrito nos itens 4.1.1.1.1 e 4.1.1.2 – foram deixados reagir por 24 h com uma relação entre as massas de proteína e polissacarídeo de 1:1. Dois valores de pH foram testados – pH de 8,5 e de 9,5.

4.1.2.2 Cromatografia por Exclusão Molecular

Para a verificação da formação do conjugado, o produto da reação foi analisado em resina Sephacryl S-300, de acordo com o que se estabeleceu no método de conjugação que ocorre na presença de espaçador (item 4.1.1.5). O cromatograma resultante desta análise é mostrado na Figura 24, com os perfis cromatográficos do PS1hid e da PspA3mod servindo como referência para a avaliação da possível presença do conjugado PS1-PspA. O resultado desta análise mostrou que não houve formação do conjugado, quando a conjugação foi realizada na ausência do espaçador. O perfil cromatográfico apresentado na Figura 24 é referente à condição de pH 8,5, no entanto, perfil semelhante foi obtido para a condição de pH 9,5.

Figura 24 - Cromatograma do produto da reação entre PS1hid e PspA3mod, em resina Sephacryl S-300.

Como já foi dito, tem sido apontado que polissacarídeos carregados positiva e negativamente, podem apresentar um maior nível de estruturação e, no caso do PS1, foi proposto que esse polissacarídeo apresenta uma conformação helicoidal (CHOI et al., 2002). Com base nessas proposições, uma primeira ideia para explicar o resultado do não estabelecimento da conjugação PS1-PspA na ausência da

molécula espaçadora (ADH), seria a possibilidade de os grupos amina do PS1 estarem inacessíveis para a ligação com as carboxilas da PspA, devido à conformação do PS1.

No entanto, foi proposto um modelo para a estrutura do PS1, apresentado na Figura 25, no qual são mostrados os grupos amina localizados na porção externa da hélice polissacarídica o que permite pensar que a conformação do PS1, por si só, não seria um fator de impedimento para seu acoplamento à proteína. Esse mesmo modelo foi estabelecido considerando a forma zwitteriônica do polissacarídeo. Supondo-se que o PS1 possa assumir, nas condições adotadas para a conjugação, sua forma de zwitterion, seus grupos amina estariam como NH_3^+ e não NH_2 , o que inviabilizaria a conjugação pelo método empregado – que envolve um ataque nucleofílico do nitrogênio do grupo amina (NH_2) ao carbono das carboxilas protéicas.

(CHOI et al., 2002)

Figura 25 - Modelo propondo que o PS1 apresenta estrutura tridimensional em hélice. Os grupos amina, presentes na estrutura desse polissacarídeo são representados pelas esferas localizadas na porção externa da hélice.

Assim, embora não seja possível afirmar a razão pela qual a conjugação não se estabelece na ausência do espaçador, é possível concluir que a ligação do PS1 ao ADH é uma etapa indispensável ao método de obtenção do conjugado.

4.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ESTRUTURAL DO PS1

É sabido que as etapas reacionais às quais são submetidos os polissacarídeos, no decorrer de processos de conjugação, podem acarretar o comprometimento de grupos importantes para a atuação dessas moléculas como indutores de resposta imunológica (CHANG et al., 2012; PAWLOWSKI et al., 1999; WANG et al., 2003). Por esta razão, alguns ensaios foram realizados com o intuito de verificar a integridade estrutural do PS1 após as etapas de modificação deste polissacarídeo, ao longo do trabalho.

4.2.1 Avaliação da Antigenicidade das formas nativa e modificadas do PS1

Uma forma de verificar possíveis alterações estruturais de um polissacarídeo é analisar sua antigenicidade (CHANG et al., 2012; PAWLOWSKI et al., 1999; WANG, 2003).

A antigenicidade do PS1 nas suas formas nativa (PS1nat) – como fornecido pelo Laboratório de Bioprocessos, hidrolisada (PS1hid), ligada à molécula espaçadora (PS1-AH) e conjugada (PS1-PspA) foi avaliada por um ensaio imunoenzimático (ELISA) de inibição, tendo sido empregados como controle positivo o PS1 comercial (PS1 ATCC) e como controle negativo o sorotipo 14, também comercial (PS14 ATCC). A Figura 26 esquematiza a metodologia do ensaio empregado. Inicialmente o soro comercial anti-PS1 foi adicionado, em microplaca, a soluções de PS1nat, PS1hid, PS1-AH e PS1-PspA para ligação de seus anticorpos aos antígenos, levando a uma inibição do soro. Após esta etapa, o soro inibido foi transferido para um ensaio de ELISA, cuja sensibilização se deu com o PS1 nativo comercial. Anticorpos que não se ligam aos antígenos na etapa de inibição se ligam ao PS1 na placa de ELISA.

Figura 26 - Esquema demonstrativo da metodologia de um ensaio de ELISA de inibição, aplicado para verificação da antigenicidade de polissacarídeos. O soro empregado no ELISA é previamente inibido pelo antígeno.

Os resultados do ensaio de ELISA de inibição são mostrados na Figura 27 e são expressos como porcentagem de inibição do soro (% Inibição) – calculadas como descrito em materiais e métodos – em função da concentração dos antígenos (PS1nat, PS1hid, PS1-AH e PS1-PspA) em $\mu\text{g/ml}$. Esses resultados mostraram a alteração do reconhecimento do PS1 – após hidrólise, ligação ao ADH e conjugação – por anticorpos anti-PS1.

Figura 27 - Resultados do ensaio de antigenicidade do PS1 nativo e após as modificações às quais foi submetido para a síntese do conjugado PS1-PspA.

De acordo com o gráfico da Figura 27, o polissacarídeo em sua forma nativa, que nos é fornecido pelo Laboratório de Bioprocessos, apresentou perfil de inibição bastante semelhante ao do PS1 comercial, indicando que no material de partida não ocorre ausência de grupos antigênicos. Outra informação que se extrai desses resultados é a de que a hidrólise foi, possivelmente, a etapa de maior impacto na alteração do reconhecimento do PS1 pelos anticorpos anti-PS1. Isso porque os resultados mostram que a porcentagem de inibição cai drasticamente da forma nativa para a hidrolisada, e mantém um comportamento semelhante para o PS1 reagido com ADH e conjugado. Assim sendo, foi considerado que possa ter ocorrido uma redução na antigenicidade do PS1 e que essa pudesse ser decorrente de um dos seguintes fatores:

- Alteração de algum grupo químico da estrutura do PS1
- Alteração de grau de estruturação ou conformação do PS1

4.2.2 Avaliação da alteração de grupos químicos da estrutura do PS1

Pensando na alteração de grupos químicos na estrutura do PS1, a etapa mais significativa seria a hidrólise em meio ácido. O PS1, como já foi mostrado na figura ilustrativa de sua unidade de repetição, é constituído pela repetição do trissacarídeo $\rightarrow 3) \alpha$ -2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxigalactose $(1 \rightarrow 4) \alpha$ -D-ácido galacturônico $(1 \rightarrow 3) \alpha$ -D-ácido galacturônico $(1 \rightarrow$, e ainda por uma quantidade não estequiométrica de grupos O-acetil (ABEYGUNAWARDANA et al., 2000; STROOP et al., 2002). Nas condições de hidrólise empregadas para a fragmentação do PS1, estes grupos O-acetil são candidatos fortes a serem afetados (CHANG et al., 2012).

Para a avaliação da perda ou alteração de grupos químicos do PS1, uma ferramenta útil seria a RMN ^1H (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio), por meio de uma análise comparativa entre espectros do PS1 nativo e hidrolisado. No entanto, uma limitação para o uso dessa técnica são os ajustes das condições de RMN ^1H para o sorotipo 1 em sua forma nativa, para que se possa adquirir um espectro com boa resolução (STROOP et al., 2002).

Embora não tenha sido possível, por limitações da infraestrutura de nosso grupo, uma comparação entre espectros das formas nativa e hidrolisada do polissacarídeo, foram extraídos dados do espectro do PS1 hidrolisado e confrontados com a literatura buscando-se uma análise da integridade do PS1. Com essa avaliação foi constatada a ausência, no espectro do PS1 hidrolisado, de um sinal na região de 2,2 ppm e que é característico dos grupos metila do o-acetil, como mostrado no espectro da Figura 28. No entanto, não foi possível afirmar que a etapa de hidrólise do PS1 foi a responsável pela eliminação desses grupos, uma vez que, como já foi mencionado, não foi possível a comparação dos espectros das formas nativa e modificada do polissacarídeo. Não se sabe, portanto, se estes grupos encontram-se presentes no PS1, antes da hidrólise.

Figura 28 - Espectro ^1H RMN para o PS1 hidrolisado, mostrando a região (2,2 ppm) onde ocorreria o sinal característico do grupo metila do o-acetil.

Embora o grupo o-acetil seja referido como importante para a antigenicidade e imunogenicidade de polissacarídeos, também em alguns casos, foi mostrado que a ausência desses grupos não conduz à redução ou perda de antigenicidade e imunogenicidade (CHANG et al., 2012; JONES, 2005), e pouco sobre a importância desta estrutura na atuação imunológica do PS1 tem sido abordado na literatura. No entanto, já foi sugerido que a presença de grupos o-acetil seja importante na manutenção da conformação do PS1 (STROOP et al., 2002) e que a conformação seja um aspecto relevante para a sua atuação imunológica.

4.2.3 Avaliação da alteração de grau de estruturação ou conformação do PS1

Uma segunda hipótese para explicar os resultados da avaliação de antigenicidade do PS1, estaria relacionada a uma possível mudança na conformação desse polissacarídeo, uma vez que tem sido sugerido que este possui uma conformação helicoidal que pode estar associada à sua imunogenicidade (CHOI et al., 2002).

Em adição aos estudos com o PS1, resultados envolvendo o PSA – o polissacarídeo capsular A de *Bacteroides fragilis*, um polissacarídeo que apresenta cargas negativas e positivas, assim como o PS1 – mostraram que os grupos carregados, presentes na estrutura de polissacarídeos zwitterionicos, podem ser responsáveis pela manutenção da conformação necessária para a atividade imunogênica dessa molécula (KREISMAN et al., 2006). Logo, a possível perda de estrutura do PS1, após as etapas envolvidas na obtenção do conjugado, pode ser algo indesejado, bem como, pode também estar associada à alteração do reconhecimento do PS1 pelos anticorpos anti-PS1, constituintes do soro comercial, observada no ensaio de ELISA de inibição. Nesse mesmo estudo envolvendo o PSA, foi mostrada a aplicação do dicroísmo circular no monitoramento de mudanças conformacionais nesse polissacarídeo (KREISMAN et al., 2006).

4.2.3.1 Dicroísmo Circular do PS1

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica comumente empregada para o estudo da estrutura secundária de proteínas e, atualmente, vem sendo também bastante útil no estudo de ácidos nucleicos. Entretanto, para polissacarídeos, a aplicação dessa técnica ainda é relativamente pouco explorada (KREISMAN et al., 2006). Sabe-se, no entanto, que a estrutura do PS1 possibilita análises por esta técnica espectroscópica, uma vez que apresenta grupos cromóforos e quiralidade, o que confere a esta molécula a capacidade de absorver diferentemente a luz circularmente polarizada nos sentidos horário e anti-horário, característica essa chamada "dicroísmo circular".

Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações conformacionais do polissacarídeo após as etapas de modificação, foram adquiridos e comparados os

espectros de CD para o PS1 nativo, hidrolisado e ligado ao espaçador. A Figura 29 apresenta os resultados que indicaram variações nos sinais dos espectros do PS1 nestas formas. Tais variações foram observadas, principalmente, nos valores dos comprimentos de onda dos pontos de elipticidade máxima, sugerindo que houve mudança da conformação ou do grau de estruturação do PS1 após as etapas de modificação.

Figura 29 - Comparação entre os espectros de CD adquiridos para o PS1 nativo (—), hidrolisado (—) e ligado ao ADH (—). Dados coletados em água e nas concentrações de 1 mg/ml. São mostradas as regiões dos espectros nas quais os sinais foram observados.

Embora a comparação dos espectros tenha sugerido que as três formas do PS1 apresentam conformações diferentes entre si, buscou-se uma maneira adicional para avaliar essa questão, na busca de respaldar os resultados indicados pela análise dos espectros.

No estudo de proteínas, uma análise de grande valia, além da determinação dos espectros de CD, é a determinação do comportamento de enovelamento ou

desenovelamento das moléculas ao longo de uma determinada faixa de temperatura. De modo análogo ao que se realiza para proteínas, o PS1 nas formas nativa, hidrolisada e com a introdução do espaçador foi avaliado quanto à sua dinâmica de enovelamento em resposta à variação de temperatura. Para tal, uma amostra de cada forma do polissacarídeo foi submetida a um aumento gradativo de temperatura – de 10 a 95 °C. Este processo gerou, conforme se aumentava a temperatura, uma perda de estrutura em todas as formas do polissacarídeo. No entanto, esta perda de estrutura foi revertida, em todos os casos, com o retorno da temperatura para os níveis originais. Cabe destacar que, embora o comportamento geral das três formas tenha sido o mesmo, foram detectadas diferenças nas taxas de perda e ganho de estrutura, resultados que podem ser expressos pela inclinação da linha de tendência resultante da análise dos dados por regressão linear. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 30.

Figura 30 - Análise do comportamento das estruturas de PS1 nativo (—), PS1 hidrolisado (—) e PS1-AH (—), quando submetidas à variação de temperatura. Em (A) são mostrados os valores para a situação de aumento da temperatura e em (B), para a redução da temperatura para os níveis originais.

Os resultados das análises por CD são resumidos na Tabela 4. Nela são mostrados os valores dos comprimentos de onda nos pontos de elipticidade máxima, extraídos dos espectros do PS1 nas formas nativa e modificadas, e os valores de inclinação das retas geradas com a análise da dinâmica de enovelamento do polissacarídeo, em função da temperatura.

Tabela 4 - Resultados das análises do PS1 por CD.

Parâmetro	Forma do polissacarídeo		
	PS1 nativo	PS1 hidrolisado	PS1-AH
Ponto de valor máximo de cada espectro (valores de λ - nm)	195,6	195,8	197,7
Inclinação da linha de tendência linear (°) (aumento de temperatura)	-4,80	-4,31	-3,13
Inclinação da linha de tendência linear (°) (redução de temperatura)	-4,58	-4,61	-3,36

Já na Tabela 5, os resultados são expressos como a variação dos parâmetros analisados - pontos de elipticidade máxima e valores de inclinação das retas geradas com a análise da dinâmica de enovelamento do PS1 – permitindo uma melhor visualização da intensidade das alterações entre esses valores e que, possivelmente, estão relacionadas a diferenças na conformação das diferentes formas do PS1.

Tabela 5 - Resultados das análises por CD, comparativos entre PS1 nativo (PS1nat), PS1 hidrolisado (PS1hid) e PS1-AH.

Parâmetro	Forma do polissacarídeo		
	PS1nat → PS1hid	PS1nat → PS1-AH	PS1hid → PS1-AH
Δ Ponto de valor máximo de cada espectro (valores de λ - nm)	0,20	2,10	1,90
Δ Inclinação da linha de tendência linear (°) (aumento de temperatura)	0,49	1,67	1,18
Δ Inclinação da linha de tendência linear (°) (redução de temperatura)	0,03	1,22	1,25

Os resultados sugerem que, caso a conformação do PS1 tenha sido afetada pela etapa de hidrólise, essa alteração foi pequena não chegando a ser significativa no que se refere ao comprometimento da imunogenicidade do polissacarídeo.

Foi interessante notar que, com base no ensaio de antigenicidade, não há diferença considerável entre PS1 hidrolisado e PS1-AH. No entanto, estes primeiros resultados do CD indicam uma alteração do grau de estruturação entre estas duas formas do PS1 e ainda pode ser observado, pelos resultados mostrados na Tabela 5, que o PS1-AH possui a estruturação mais distinta entre as três formas do PS1.

Cabe ressaltar que, como são escassos os estudos envolvendo dicroísmo circular para a análise da estrutura de polissacarídeos, não se pode afirmar que esses resultados representam diferenças estruturais consideráveis entre essas três formas do PS1, sendo as considerações acima apenas suposições.

4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL INDUZIDA PELO CONJUGADO PS1-PSPA

Os estudos quanto à integridade estrutural do PS1, realizados neste trabalho, sugeriram que alterações podem ter ocorrido na estrutura ou conformação do PS1, em decorrência das etapas de modificação. No entanto, tais estudos não foram

conclusivos quanto ao que foi alterado na estrutura do PS1, impossibilitando prever se tais alterações poderiam interferir na imunogenicidade do polissacarídeo conjugado. A avaliação da resposta imune humoral induzida pelo conjugado PS1-PspA foi, portanto, uma forma de verificar a imunogenicidade do conjugado obtido, no que se refere a resposta anti polissacarídeo.

No caso da conjugação do presente estudo, a avaliação da integridade dos epítopos da proteína também se fez necessária. Isso, para garantir a atuação imunogênica da PspA, uma vez que, como já foi mencionado, tem se por objetivo uma conjugação que confira maior proteção pelo uso de uma proteína pneumocócica como carreadora.

A resposta humoral, induzida pelo conjugado PS1-PspA em animais, foi avaliada em comparação à resposta induzida pelos mesmos elementos da conjugação, porém co-administrados – isto é, PS1hid e PspA3mod não ligados mas administrados em uma mesma dose. A presença de IgG anti-PS1 e anti-PspA nos soros dos animais, após a terceira imunização, foi avaliada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que permitiram a determinação de títulos de IgG. Essa avaliação se justifica por serem os anticorpos IgG importantes na atuação contra infecções pneumocócicas (PAWLOWSKI, et al., 2000). Na Tabela 6 são mostrados os grupos dos ensaios imunes e a constituição das doses administradas.

A fim de eliminar a possibilidade de que ocorresse favorecimento da resposta humoral por conta de efeitos de dose, as massas de PS1 e de PspA administradas foram fixadas em 8,6 µg e 5 µg, respectivamente, nos grupos de co-administrado e conjugado.

Sabe-se que a quantidade mínima para se verificar resposta humoral anti-PspA é 5 µg, e este valor foi adotado para os ensaios imunes realizados neste trabalho. Sendo a relação das massas de polissacarídeo e proteína, no conjugado em estudo, de 1,7:1, as doses administradas foram constituídas por 8,6 µg de PS1 e 5 µg de PspA. Desse modo foi garantido o necessário para indução da produção de IgG anti-proteína.

Um contraponto de estabelecer as quantidades que compõem as doses com base no necessário para se ter geração de resposta anti-PspA, foi a administração de doses muito superiores ao que é tradicionalmente administrado no caso de estudos com polissacarídeos – em torno de 1 a 2,5 µg (GALLORINI et al., 2009; MAWAS et al., 2001; WANG et al., 2003), o que requer cautela na análise dos

resultados. Em relação à vacina comercial Prevenar® 13-valente, que inclui o sorotipo 1 e foi administrada como um controle, por exemplo, a quantidade de PS1 nas doses é cerca de quatro vezes menor do que a administrada para o conjugado PS1-PspA.

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de uma resposta imune anti-PS1 dose dependente, um grupo (grupo IV) foi escolhido para avaliação da resposta induzida por uma massa de 5 µg do polissacarídeo conjugado, para verificar o efeito da redução de massa de PS1 nesta indução de resposta. A vacina conjugada comercial Prevenar® 13-valente, cuja constituição inclui o PS1 conjugado à proteína carreadora CRM₁₉₇, foi administrada como um controle da indução de resposta anti PS1.

Tabela 6 - Grupos e composições de doses administradas nos ensaios imunes do conjugado PS1–PspA.

Grupo	PS1 (µg)	PspA (µg)	Al(OH) ₃ (µg)
I. Controle (salina)*	-	-	200
II.Co-administrado (PS1hid + PspAmod)	8,6	5	200
III. Conjugado 1(PS1-AH - PspAmod)	8,6	5	200
IV. Conjugado 2(PS1-AH - PspAmod)	5	2,9	200
V.Prevenar® (PS1 – CRM ₁₉₇) **	2,2	-	125

*Grupo salina recebeu solução 0,9% NaCl.

**A Prevenar® contém aproximadamente 32 µg da proteína carreadora CRM₁₉₇.

4.3.1 Avaliação da Resposta Imune Humoral anti-PS1

Os títulos de IgG anti-PS1 foram determinados para cada grupo e expostos como um conjunto de dados que é apresentado no gráfico da Figura 31. As análises estatísticas estiveram baseadas na comparação entre o comportamento médio dos

valores, representado no gráfico pelos traços horizontais dispostos entre os pontos, sendo esses pontos representativos dos valores de título de IgG referentes a cada um dos 5 animais de cada grupo.

Figura 31 - Títulos de IgG anti-PS1 nos soros provenientes de imunizações com os conjugados PS1-PspA (Conj 1 e Conj 2), com o co-administrado de PS1 e PspA (Co-adm) e com a vacina comercial Prevenar®. (ns) representa valores que não são significativamente diferentes. (*) indica diferenças significativas nos valores de títulos ($p < 0,05$).

Os títulos de IgG anti-PS1 induzidos por imunizações com o conjugado PS1-PspA apresentaram valores significativamente maiores, em comparação aos do co-administrado, sugerindo a eficácia da conjugação. Como no caso do co-administrado não há a ligação polissacarídeo-proteína, não se tem a produção de IgG anti-PS1 e os valores de título de IgG são semelhantes aos do grupo controle, imunizado com solução salina.

Os valores de títulos de IgG para os grupos imunizados com o conjugado PS1-PspA e com a Prevenar® não mostraram valores significativamente distintos o que, como já foi demonstrado anteriormente (CSORDAS et al., 2008 SANTAMARIA et al., 2011; PERCIANI et al., 2014), confirma que a PspA tem boa atuação como proteína carreadora. Esses resultados também permitiram verificar a imunogenicidade do PS1 nesta conjugação, sugerindo que, as possíveis alterações estruturais – avaliadas nos estudos sobre a integridade estrutural do polissacarídeo

– não resultaram na perda de imunogenicidade. A conclusão mais imediata disso seria a de que o que foi alterado na estrutura do PS1 pode ser um aspecto não relacionado à indução de anticorpos capazes do reconhecimento do PS1.

Foi importante considerar que as doses, com as quais os animais foram imunizados, diferiram entre si quanto à massa de PS1 – 2,2 µg nas doses de Prevenar® e 5 µg e 8,6 µg nas doses do conjugado PS1-PspA. No entanto, os valores de título de IgG foram semelhantes para todos os casos.

Com estes resultados, três possibilidades podem ser consideradas para explicar o comportamento da produção de IgG observado: 1) a resposta humoral não apresentou uma dependência da dose, na faixa de massa de antígenos utilizada; 2) a resposta humoral atingiu seu patamar e a produção de IgG alcançou seu limite superior e, dessa forma, mesmo com o aumento da quantidade de PS1 na dose a resposta se manterá em um mesmo nível; 3) o conjugado obtido neste trabalho pode ser menos imunogênico em relação ao que constitui a vacina comercial, exigindo a administração de doses mais elevadas para gerar uma resposta de mesmo nível que o gerado pela vacina comercial.

Merecem atenção os valores de títulos determinados para o grupo controle, que podem ser considerados elevados, uma vez que os animais pertencentes a esse grupo foram imunizados com solução salina. Embora os valores dos títulos de IgG-anti PS1 induzidos por imunizações com o conjugado PS1-PspA tenham apresentado valores significativamente maiores, em comparação aos do co-administrado, a indução de anticorpos promovida por esta conjugação pode não ser tão elevada quanto sugerem esses valores de títulos. Uma alternativa seria a realização de alterações no protocolo de ELISA uma vez que o observado pode ser decorrente de ligações inespecíficas ocorridas nestes ensaios.

4.3.2 Avaliação da Resposta Imunológica anti-PspA3

O gráfico obtido para os títulos de IgG anti-PspA é mostrado na Figura 32. Assim como para os resultados da resposta anti-PS1, as análises estatísticas foram baseadas na comparação entre o comportamento médio dos valores, representado no gráfico pelos traços horizontais dispostos entre os pontos, sendo esses pontos representativos dos valores de título de IgG referentes a cada um dos 5 animais de cada grupo.

Figura 32 - Títulos de IgG anti-PspA nos soros provenientes de imunizações com o conjugado PS1-PspA (Conj 1) e com o co-administrado de PS1 e PspA (Co-adm). (*) indica diferenças significativas nos valores de títulos ($p < 0,05$).

Os resultados mostram uma menor indução da produção de IgG anti-PspA, quando as imunizações se deram com o conjugado PS1-PspA, em relação à mesma indução decorrente das imunizações com o co-administrado contendo o PS1 e a PspA. Esse resultado, embora não fosse previsto, é algo possível, uma vez que já foi descrito que a conjugação com polissacarídeos pode acarretar comprometimento da imunogenicidade da proteína conjugada, sendo o grau deste comprometimento variável de acordo com o polissacarídeo envolvido na conjugação (KAMBOJ et al., 2003; MCCOOL et al., 1999). Fatores como o método de conjugação e o tamanho do espaçador empregado podem também estar relacionados à questão do comprometimento ou inacessibilidade de epítomos de proteínas, quando conjugadas (HUANG et al., 2013).

Embora os valores dos títulos de IgG anti-PspA tenham sido inferiores quando a proteína é conjugada, o conjugado PS1-PspA pode ser protetor. A verificação quanto à atuação protetora do conjugado requer ensaios imunes de outra natureza e que irão contribuir para uma melhor caracterização da resposta imune induzida pelo conjugado PS1-PspA, uma vez que se faz necessária, para respaldar um candidato

vacinal, uma avaliação da funcionalidade dos anticorpos produzidos. Ensaio de opsonofagocitose poderiam contribuir para essa análise e são atualmente aceitos para avaliação da eficácia vacinal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o trabalho desenvolvido foi possível estabelecer um protocolo para obtenção e purificação de um conjugado entre PS1 e PspA.

O PS1 se mostrou um polissacarídeo de comportamento bastante diferenciado em relação aos já trabalhados pelo grupo, sendo o único dentre estes que apresenta caráter zwitteriônico.

O método de conjugação que levou a obtenção do conjugado PS1-PspA, foi baseado no método de conjugação atualmente empregado em nosso grupo de trabalho e que possibilitou as conjugações dos polissacarídeos PS6B e PS14. No entanto, este método foi adaptado ao PS1 o que permitiu a eliminação de uma etapa – a oxidação do polissacarídeo.

Ao longo do trabalho para estabelecer a síntese deste conjugado, questões relevantes surgiram, o que conduziu o projeto para uma análise de aspectos intrínsecos ao PS1, sua estrutura e particularidades. Isto conduziu a análises do impacto das etapas reacionais sobre a estrutura do PS1.

Os estudos quanto à resposta imune induzida pelo conjugado obtido ainda necessitam de análises adicionais para avaliação da proteção conferida pelo mesmo.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABEYGUNAWARDANA, C.; WILLIAMS, T. C.; SUMNER, J. S.; HENNESSEY JR, J. P. Development and Validation of an NMR-Based Identity Assay for Bacterial Polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 226-240, 2000.

AUZAT, I.; CHAPUY-REGAUD, S.; LE BRAS, G.; DOS SANTOS, D.; OGUNNIYI, A. D.; LE THOMAS, I.; GAREL, J. R.; PATON, J. C.; TROMBE, M. The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* : its involvement in competence and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1018–1028, 1999.

BAKER, P.J. T Cell Regulation of the Antibody Response to Bacterial Polysaccharide Antigens: An Examination of Some General characteristics and their Implications. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 1, p. S44-S48, 1992.

BARAZZONE G. C.; PERCIANI, C. T.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. **Método de conjugação de polissacarídeo capsular a uma proteína carregadora, para uso como antígeno vacinal contra bactérias encapsuladas, utilizando o reagente cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM)**” 2009. [Patente]

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. **Lancet**, v. 4, p. 144-154, 2004.

BOGAERT, D. H. P.; ADRIAN, P. V.; RUMKE, H. C.; GROOT. R. *Pneumococcal vaccines: an update on current strategies*. **Vaccine**, v. 22, p. 2209-2220, 2004.

BONTEN, M. J. M et al. Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults. **N. engl. J. med.**, v. 372, n. 12, 2015.

BRANDILEONE, M. C. C. et al. Appropriateness of pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.**, v.187, p. 1206-1212, 2003.

BRANDILEONE, M. C. C. et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, v. 22, p. 3890-3896, 2004.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of Pneumococcal Conjugate Vaccine on the Prevention of Invasive Pneumococcal Diseases. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 3, p. S67-S74, 2006.

BRILES, D. E.; KING, J. D.; GRAY, M. A.; MCDANIEL, L. S.; SWIATLO, E.; BENTON, K. A. PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. **Vaccine**, v.14, p. 858-867, 1996.

BRUEGGEMANN, A. B.; SPRATT, B. G. Geographic Distribution and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 1 Isolates. **Jornal of clinical microbiology**, v. 41, p. 4966-4970, 2003.

BUTLER, J. C.; BREIMAN, R. F.; CAMPBELL, J. F.; LIPMAN, H. B.; BROOME, C. V.; FACKLAM, R. R. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: Na evaluation of current recommendations. **JAMA**, v. 270, n. 15, p. 1826-1831, 1993.

BYRD, W; SOLOMON, K. Preparation, Characterization, and Immunogenicity of Conjugate Vaccines Directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* Virulence Determinants. **Infection and immunity**, v. 60, n. 80, p. 3042-3051. 1992.

CARVALHO JR, R. Produção e Purificação de um Fragmento Recombinante da Proteína A de Superfície do Clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli*. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CASTAÑEDA, E. et al. Laboratory-Based Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* Disease in Children in 10 Latin American Countries: A SIREVA II Project, 2000-2005. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 9, p. e264-e270, 2009.

CHANG, J. et al. Relevance of O-acetyl and phosphoglycerol groups for the antigenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 18C capsular polysaccharide. **Vaccine**, v.30, p. 7090-7096, 2012.

CHOI, Y-H; ROEHRL, M. H.; KASPER, D. L.; WANG, J. Y. A unique structural pattern shared by T-cell-activating and abscesso-regulating zwitterionic polysaccharides. **Biochemistry**, v. 41, p. 15144-15151, 2002.

CONN, E.E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

CSORDAS et al. Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Vaccine**, v. 26, n. 23, p. 2925-2929, 2008.

DANIELS, C. C. et al. Capsule does not block antibody binding to PspA, a surface virulence protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 40, n. 5, p. 228-233, 2006.

DAUM, R.; HOGGERMAN D.; RENNELS M.; BEWLEY K.; MALINOSKI F.; ROTHSTEIN F.; REISINGER K.; BLOCK S.; KEYSERLING H.; STEINHOFF M.

Infant Immunization with Pneumococcal CRM197 Vaccines: Effect of Saccharide Size on Immunogenicity and Interactions with Simultaneously Administered Vaccines. **The Journal of Infectious Diseases**. v.176, p. 445–455, 1997.

DAWSON, C. What is a pneumococcus? In: TUOMANEN E, M. T.; MORRISON, D. A.; SPRATT, B. G. (eds.). **The Pneumococcus**. Washington, D.C.: ASM, 2004 p. 30-48.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ECHÁÑIZ-AVILÉS, I. G.; SOLÓRZANO-SANTOS, F. Meeting the challenge: Prevention of pneumococcal disease with conjugate vaccines. **Salud Pública Méx.**, v. 43, n. 4, p. 352-367, 2001.

FAUSNAUGH, J.L.; KENNEDY, L.A.; REGNIER, F.E.; 1984. Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. **J. Chromatogr.** v. 317, p. 141–155, 1984.

GALLORINI et al. Toll-like receptor 2 dependent immunogenicity of glycoconjugate vaccines containing chemically derived zwitterionic polysaccharides. **PNAS**, v. 106, n. 41, p. 17481–17486, 2009.

GONZÁLEZ A, F.J.Y.F.C., Immune responses to polysaccharides: Lesson from humans and mice. **Vaccine**, v. 26, p. . 292-300, 2008.

GORDON, S.B. et al Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2286–2293, 2000.

HAUSDORFF, W. P.; SIBER, G. R.; PARADISO, P. R. Multivalent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate composition. United States, 2009. [Patente]

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

HUANG, Q. et al. PEG as a spacer arm markedly increases the immunogenicity of meningococcal group Y polysaccharide conjugate vaccine. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 382–389, 2013.

HYAMS, C. et al. The *Streptococcus pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 2, p. 704-715, 2010.

JONES, C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *Na Acad. Bras. Cien.*, v. 77, n. 2, p. 292-300, 2005.

KADIOGLU, A. et al. The Role of *Streptococcus pneumoniae* Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 288-301, 2008.

KAMBOJ, K. K.; KIRCHNER, H. L.; KIMMEL, R.; GREENSPAN, N. S.; SCHREIBER, J. R. Significant variation in serotype-specific immunogenicity of the seven-valent *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-CRM₁₉₇ conjugate vaccine occurs despite vigorous T cell induced by the carries protein. **J. Infect. Dis.**, v. 197, n. 10, p. 1629-1638, 2003.

KALKA-MOLL, W. M.; TZIANABOS, A. O.; BRYANT, P. W.; NIEMEYER, M.; PLOEGH, H. L.; KASPER, D. L. Zwitterionic Polyssaccharides Stimulate T Cell by MHC-dependent Interactions. **J Immunol**; v.169, p.6149-6153, 2002.

KAMERLING, J. P. Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. In : Tomasz, A. (Ed.) *Streptococcus pneumonia Molecular Biology and Mechanisms of Disease*. New York: Mary ann Liebert Publishers Inc., p.81-114, 2000

KÄYHTY, H.; KARANKI, H.; MÄKELÄ, P.H. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. **Pediatrics**, v. 74, p. 857-865, 1984.

KIM, J. et al. *Determination of saccharide content in pneumococcal polysaccharides and conjugate vaccines by GC-MSD*. **Anal. Biochem.**, v. 347, p. 262–274, 2005.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with virulence in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 177, p. 368-377, 1998.

KLEIN, D. L.; ELLIS, W. E. Conjugate vaccine against *Streptococcus pneumoniae*. In: Levine, M. M.; WOODROW, G. C.; KAPER, J. B.; COBON, G. S. (eds.). **New generation vaccines**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p .503-525.

KNISKERN, P. J.; MARBURG, S. Conjugation: design, chemistry and analysis. In: ELLIS, R. W., GRANOFF, D. M. (eds.) **Development and clinical usus of Haemophilus b conjugate vaccines**. New York:Marcel Dekker, 1994 p. 37-69.

KNISKERN, P. J. et al. Characterization and evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine expressed in yeast defective for N-linked hyperglycosylation. **Vaccine**, v.12, n.11, p.1021-1025,1994.

KREISMAN, L. S. C.; FRIEDMAN, J. H.; NEAGA, A.; COOB, B. A. Structure and function relations with a T-cell-activating polysaccharide antigen using circular dichroism. **Glycobiology**, v. 17, n. 1, p. 46-55, 2006.

LAFERRIERE, C. A.; SOOD, R. K.; MUYS, J. M.; MICHON, F.; JENNINGS, H. L. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain lengh on immunogenicity. **Vaccine**, v. 15, p. 179-186, 1997.

LEE, et al. Efficacy and effectiveness of extended-valency pneumococcal conjugate vaccines. **Korean J Pediatr.** v.57, p.55-66, 2014.

LEES, A.; PUVANESARAJAH, V.; FRASCH, C.E. Conjugation chemistry. In: SIBER, G.R.; KLUGMAN, K.P.; MÄKELÄ, P.H. (Eds.). In: *Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine*. Washington, D. C.: ASM, 2008. cap.11, p. 163-174.

LINDBERG, A. A. Glycoprotein conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 28-36, 1999.

MALLEY, R. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. **J. Mol. Med.**, v. 88, p. 135-142, 2010.

MARTHOS, B. V. **Estabelecimento de condições de cultivo de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1 para produção do polissacarídeo capsular**. 2012. 110 f. - Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MASSALDI, H.; BESSIO, M. I.; SUÁREZ, N.; TEIXEIRA, E.; ROSSI, S.; FERREIRA, F. Feature of bacteria growing and polysaccharide production of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 55, p. 37-43, 2010.

MAWAS, F.; FEAVERS, I. M.; CORBEL, M. J. Serotype of *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide Can Modify the Th1/Th2 cytokine profile and IgG Subclass Response to Pneumococcal-CRM197 Conjugate Vaccines in a Murine Model. **Vaccine**, v. 19, p. 1159-1166, 2001.

MCCOOL, T. L.; HARDING, C. V.; GREENSPAN, N. S.; SCHREIBER, J. R. B- and T-Cell Immune Responses to Pneumococcal Conjugate Vaccines: Divergence between Carrier and Polysaccharide-Specific Immunogenicity. **Infect. Immun**, v. 67, n.9, p. 4862-4869, 1999.

MEHR, S.; WOOD, N. *Streptococcus pneumoniae* – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 13 p. 258–264, 2012.

MUSHER, D. M. How Effective is Vaccination in Preventing Pneumococcal Disease? **Infect Dis Clin.**, v. 27, p. 229–241, 2003.

PAWLOWSKI, A.; KALLENIOUS, G.; SVENSON, S. B. Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. **Vaccine**, v. 18, p. 1873-1885, 2000.

PERCIANI, C. T.; BARAZZONE, G. C.; GOULART, C.; CARVALHO, E.; CABRERA-CRESPO, J.; GONÇALVES, V. M.; LEITE, L. C. C.; TANIZAKI, M. M. Conjugation of Polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with Pneumococcal Surface Protein A: PspA Conformation and Its Effect on the Immune Response. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 20, p. 858-866, 2013.

POLAND, G. A. The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p.1674-1679, 1999.

POOLMAN, J. September 2005. *Vaccine*. U.S. patent application no. 10/498,900. [Patente]

QI., X. Y.; KEYHANI, N. O.; LEE, Y. C. Spectrophotometric determination of hydrazine and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid. **Anal. Biochem.**, v. 175, p. 139-144, 1988.

QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**. v. 87, p. 143–159, 2001.

RITCHIE, N. D.; MITCHELL, T. J.; EVANS, T. J. What is different about serotype 1 pneumococci. **Future Microbiol.** v. 7, n.1, p. 33–46, 2012.

SANTAMARIA, R.; GOULART, C.; PERCIANI, C. T.; BARAZZONE, G. C.; CARVALHO JUNIOR, R. ; GONÇALVES, V. M.; LEITE, L. C. C.; TANIZAKI, M. M. Humoral immune response of a pneumococcal conjugate vaccine: Capsular polysaccharide serotype 14 Lysine modified PspA. **Vaccine**, v. 29, p. 8689-8695, 2011.

SANTAMARIA, R. **Desenvolvimento e Avaliação da Resposta Imune Humoral de uma Vacina Anti-Pneumocócica Conjugada: Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 – Proteína de Superfície Pneumocócica A**. 138f. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS et al., Serotype distribution of *Streptococcus pneumonia* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**, v. 31, p. 6150– 6154, 2013.

SCHMOLE-THOMA et al. Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1015–1023, 2008.

SCHNEERSON, R. et al. Quantitative and qualitative analyses of sérum antibodies elicited in adults by *Haemophilus influenza type b* and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 519-528, 1986.

SENGUPTA, P. et al. Determination of the immunodominant part in the O-antigenic polysaccharide from *Escherichia coli* O128 by ELISA-inhibition study. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 133-137, 2000.

SERRANO, I.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Heterogeneity of pneumococcal phase variants in invasive human infections. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 67, 2006.

SHAFER, D. E.; SCHUMAN, R. F.; NELSON, B. L.; MOND, J. J.; LEES, A. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate

(CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunologica, **Vaccine**, v. 18, p. 1273-1281, 2000.

SHAPER, M. et al. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5031–5040, 2004.

STEFANETTI, G. et al. Impact of conjugation chemistry on the immunogenicity of *S. Typhimurium* conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 32, p. 6122–6129, 2014.

STROOP, C. J. M.; XU, Q.; RETZLAFF, M.; ABEYGUNAWARDANA C.; BUSH, C. A. Structural analysis and chemical depolymerization of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumonia* type 1. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 335-344, 2002.

TALAGA, P.; VIALLE, S.; MOREAU, M. Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. **Vaccine**, v. 20, n. 19, p. 2474-2484, 2002.

TILLET, W. S.; AVERY, O. T.; GOEBEL, W. F. Chemo-Immunological Studies on Conjugated Carbohydrate-Proteins: iii. Active and Passive Anaphylaxis with Syntetic Sugar-Proteins. **J. Exp. Med.**, v. 50, n. 5, p. 551-567, 1929.

TONNAER, E. L. G. M. et al. Advances in understanding the pathogenesis of pneumococcal otitis media. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, p. 546-552, 2006.

TRABULSI, L. R. J.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Athneu, 2005. 199-203 p.

TRÜCK, J. et al. The zwitterionic type 1 *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide does not induce memory B cell formation in humans. **Immunobiology**, v. 218, p. 368– 372, 2012.

TYLLIANAKIS, P. E. et al. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligands using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 219, n. 2, p. 335-340, 1994.

TZIANABOS, A. O., FINBERG, R. W., WANG, Y., CHAN, M., ONDERDONK, A. B., JENNINGS, H. J., AND KASPER, D. L. T cells activated by zwitterionic molecules prevent abscesses induced by pathogenic bacteria. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 6733-6740, 2000.

VELA-CORAL, M. C. et al. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 832-836, 2001.

VLIEGENTHART, J. F. G. Carbohydrate based vaccines. **FEBS Letters**. v. 580, p. 2945-2950, 2006.

WANG, j. Y.; CHANG, A. H.C.; GUTTORMSEN, H-K.; ROSAS, A. L.; KASPER, D.L. Construction of designer glycoconjugate vaccines with size-specific oligosaccharide antigens and site-controlled coupling. **Vaccine**, v. 21 p. 1112–1117, 2003.

WEINBERGER, B., GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Vaccines for the elderly. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p. 100-108, 2012.

WEINBERGER D. M., MALLEY R., LIPSITCH M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, v.12, 2011.

WILLIAMS, B.; GOUWS, E.; BOSCHI-PINTO, C.; BRYCE, J.; DYE, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **Lancet. Infect. Dis.** v. 2, p. 25-32, 2002.