

**Carolina Salcedo Rivillas**

**Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações vacinais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

São Paulo  
2015

**Carolina Salcedo Rivillas**

**Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações vacinais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira

Versão original

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 não autorizada pelo autor

Rivillas, Carolina Salcedo.

Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações vacinais / Carolina Salcedo Rivillas. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira.

Tese (Doutorado) – 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 contra *Streptococcus pneumoniae*.

Versão do título para o inglês: Development of protein vaccines against *Streptococcus pneumoniae*: characterization of adjuvant components of cellular pertussis vaccine and analysis of new vaccine combinations.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Vacina 3. PspA 4. *Bordetella pertussis* 5. Anticorpos 6. Sistema complemento I. Oliveira, Profa. Dra. Maria Leonor Sarno de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB054/2015

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

---

Candidato(a): Carolina Salcedo Rivillas.

Título da Tese: Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações vacinais.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

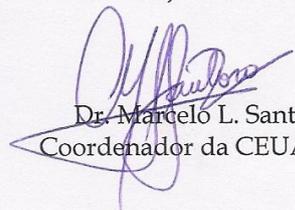
ceuaib@butantan.gov.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise das propriedades adjuvantes dos componentes de *Bordetella pertussis* em combinação com antígenos proteicos de *Streptococcus pneumoniae*", protocolo nº 824/11, sob a responsabilidade de Maria Leonor Sarno de Oliveira e Carolina Salcedo Rivillas - 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 20/6/12.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	ADITIVO/OBSERVAÇÃO
06/2011 - 07/2015 Centro de Biotecnologia - Laboratório de Biotecnologia Molecular I	264 camundongos Balb/c (F)	Alteração de vigência e interessado

São Paulo, 22 de junho de 2012.

  
Dr. Marcelo L. Santoro  
Coordenador da CEUAIB

”Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Dedico a mi mamá este trabajo, pues, a pesar de los muchos kilómetros que nos separan, siempre estuviste muy cerca de mi corazón, apoyándome y motivándome con tu inmenso e incondicional amor y cuidado. Estas palabras no describen todo lo que tú representas y significas en mi vida, pero son un pequeño destello de lo que mi corazón guarda por ti:

*Madre, quiero agradecerte  
que estés en mi vida.  
Sé que puedo contar contigo  
en momentos difíciles,  
sé que contigo puedo  
compartir mis alegrías,  
y sé que nuestra amistad  
se sustenta en mutuo amor.*

*Que seas mi MAMÁ y mi AMIGA  
es el más preciado tesoro,  
que agradeceré a DIOS eternamente.*

*Gracias por llenar mi vida  
con tanta felicidad y amor....*

*Te Amo Mamá!*

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, por estar sempre presente e disposta a me escutar e aconselhar com o único propósito de melhorar. Pela paciência e por me acompanhar nesta determinante fase da minha vida. Só tenho a lhe agradecer, de coração, muito obrigada!.

À Dra. Eliane Namie Miyaji, pelos seus conselhos, pelas nossas diversas conversas profissionais que, com certeza, contribuíram positivamente neste trabalho, pela sempre boa disposição para ajudar e discutir os assuntos sempre com visão e pensamento crítico, muito obrigada!

À Dra. Alessandra Soares Schanoski, pela sempre boa disposição para ajudar e discutir os resultados deste trabalho, pelos seus conselhos e apoio. Gostaria de ter tido a oportunidade de viver mais experiências profissionais com você.  
Obrigada por tudo!

Aos colegas do laboratório, Dr. Enéas, Dra. Jô, Aline, Msc Cinthia, Dra. Juliana, Rubia, Rafaela, Júlia, Fabiana, Marcela, pela companhia nos almoços, pelas risadas, conversas e conselhos compartilhados. A todos vocês deixo o meu muito obrigado!

Ao Dr. Camille Locht e à Dra Nathalie Mielcarek, pela oportunidade de realizar parte deste trabalho no seu laboratório do Instituto Pasteur em Lille, França, só tenho a lhes agradecer por tornar esta experiência possível. Muito obrigada!

À Anne-sophie, pela sua sempre boa disposição para me orientar e ajudar na realização dos diferentes experimentos no laboratório do Dr. Camille Locht, por ter me acolhido tão bem, por tudo isto e muito mais, obrigada!

Ao Jorge, pelo carinho e pela boa disposição para me auxiliar nas diferentes leituras no citômetro de fluxo. A sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho, obrigada!

À família que apesar da distância e da saudade tem sido sempre o meu apoio e motivação para me levantar e continuar o caminho. Obrigada por serem quem vocês são, a minha família! E por todo o seu amor, levo sempre vocês no meu coração, principalmente Cielo, minha mãe, amo vocês!.

Ao Paulo pelo seu apoio incondicional, por sempre me ouvir e discutirmos sobre os mais diversos assuntos. Pelas palavras de apoio e força que sempre escutei, pela compreensão e por sempre suportar com muita firmeza os meus momentos de fraqueza. Dou graças a Deus por colocar você na minha vida!

Aos meus amigos Aline, Roberto, Débora, Daniela, Karine, Priscila e Raíza pelos momentos de descontração, pelas longas conversas e boas jantas compartilhadas,

pela simpatia de todos vocês e pelas palavras de apoio e força recebidos,  
obrigada! Levo vocês no meu coração!

Aos funcionários do Instituto Butantan, especialmente Izilda, Nidia e Vera, pelo seu apoio, colaboração e sempre boa disposição. Muito obrigada pelo carinho que sempre demonstraram!

Aos funcionários do serviço de Biblioteca do ICB, pelo trabalho com tanta dedicação e sempre de forma eficiente, por sempre me fornecer a ajuda e orientações necessárias de forma tão gentil.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, e FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

Agradeço a todos os que de uma ou outra forma contribuíram na realização desse trabalho.

Agradeço acima de tudo a Deus, pelo aprendizado e por ter me acompanhado nesta etapa da minha vida, por ter me segurado nos momentos mais difíceis e ter me dado a força para levantar depois de cada queda, sem Ele nada disto teria sido possível!

“Para aqueles que crêem, nenhuma explicação é necessária; e para aqueles que não crêem, nenhuma explicação é possível”.

Santo Inácio de Loyola

## RESUMO

Rivillas CS. Desenvolvimento de vacinas proteicas contra *Streptococcus pneumoniae*: caracterização dos componentes adjuvantes da vacina celular pertussis e análise de novas combinações. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é uma bactéria gram positiva, responsável por doenças graves como pneumonia, meningite e septicemia que causam a morte de cerca de 1 milhão de crianças menores de 5 anos, a cada ano, no mundo todo. Diversos grupos de pesquisa têm buscado o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos proteicos como alternativas às vacinas atuais, baseadas em polissacarídeos capsulares, que induzem proteção apenas contra sorotipos presentes nas formulações. Em trabalhos prévios, o nosso grupo demonstrou o potencial protetor de uma formulação vacinal composta pela proteína A da superfície de pneumococo (PspA), usando a vacina celular pertussis (wP, que é parte da vacina tríplice contra difteria, tétano e pertussis, DTPw) como adjuvante. Os resultados mostraram que a indução de altos níveis de anticorpos e a proteção de camundongos, submetidos a diferentes desafios com pneumococo, não é dependente da ação adjuvante do lipopolissacarídeo presente na wP. Neste trabalho, os componentes de *B. pertussis* envolvidos na atividade adjuvante em combinação a PspA do clado 5 (PspA5) foram avaliados através do uso de mutantes de *B. pertussis* com baixa expressão ou ausência de fatores de virulência, ou de alguns componentes purificados da bactéria. Os resultados mostraram que a imunização de camundongos com as formulações contendo a toxina pertussis (PT), tanto através da combinação de PspA5 a *B. pertussis* selvagens, ou à PT purificada, induziram os níveis mais altos de anticorpos anti-PspA5 e proteção significativa contra o desafio letal com pneumococo. Através do uso do OligB, uma subunidade de PT que não apresenta atividade enzimática, foi possível observar que a ação adjuvante não depende desta atividade. O papel da IgG anti-PspA5 na proteção induzida pela vacina PspA5-wP foi avaliado através de diferentes experimentos. A imunização de camundongos “knockout”, defectivos para maturação de linfócitos B, com PspA5-wP, não conferiu proteção aos animais contra o desafio letal por pneumococo. Experimentos de imunização passiva com soro ou IgG purificada, derivados de animais imunizados com PspA5-wP, demonstraram o papel protetor da IgG anti-PspA5 neste modelo. Além disso, a imunização passiva de camundongos com o fragmento (Fab')<sup>2</sup> de IgG, responsável pelo reconhecimento do antígeno, não foi capaz de proteger os animais contra o desafio por pneumococo. Este resultado indica a importância da porção Fc do anticorpo, responsável pela ligação a componentes do sistema complemento. Apesar dos altos níveis de IgG anti-PspA5 nos animais imunizados com PspA5-wP, a sobrevivência foi abolida após a depleção de proteínas de complemento durante o desafio. Por fim, a vacina BCG, testada como adjuvante em combinação a PspA5, não alterou

significativamente a resposta ao antígeno. Entretanto, experimentos de dose-reforço, utilizando BCG e DTPw combinados a PspA5, apresentaram resultados promissores, induzindo altos níveis de anticorpos anti-PspA5 e proteção contra o desafio invasivo por pneumococo. Os resultados deste trabalho confirmam o potencial uso de vacinas celulares, aprovadas para uso humano, como adjuvantes para PspA. Além disso, contribuem para a compreensão dos mecanismos adjuvantes de *B. pertussis* e dos mecanismos envolvidos na proteção de vacinas compostas pelo antígeno PspA.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*. PspA. *Bordetella pertussis*. Vacinas. Anticorpos. Sistema complemento.

## ABSTRACT

Rivillas CS. Development of protein vaccines against *Streptococcus pneumoniae*: characterization of the adjuvant components of the cellular pertussis vaccine and analyze of new vaccine combinations. [Ph. D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a gram-positive bacterium that causes serious diseases such as pneumonia, meningitis and septicemia and causes the death of about 1 million children under 5 years, every year, worldwide. Several research groups have sought to develop vaccines based on protein antigens as alternative to current vaccines, which are based in capsular polysaccharide, that induce protection only to serotypes present in the formulations. In previous works, our group demonstrated the protective effect of a vaccine composed by the pneumococcal surface protein A (PspA), using the cellular pertussis vaccine (wP, a part of the trivalent vaccine against diphtheria, tetanus and pertussis, DTPw) as adjuvant. The results showed that the induction of high levels of antibodies and the protection of mice, submitted to different challenges with pneumococci, were not dependent of the adjuvant effect of the lipopolysaccharide contained in wP. In this work, the *B. pertussis* components involved in the adjuvant activity when combined with PspA from clade 5 (PspA5) were evaluated through the use of mutants from *B. pertussis* with low expression or absence of virulence factors, or the use of purified components from the bacterium. The results showed that the immunization of mice with the formulations containing pertussis toxin (PT), by combination of both wild type *B. pertussis* or purified PT with PspA5, induced the highest levels of anti-PspA5 antibodies and significant protection against the pneumococcal lethal challenge. Through the use of OligB, the non-toxic PT subunit, it was possible to determine that the adjuvant activity is not dependent on the enzymatic activity of the toxin. The role of anti-PspA5 IgG on protection induced by the PspA5-wP vaccine was evaluated through different experiments. Immunization of knockout mice, defective for the maturation of B lymphocytes, with PspA5-wP, did not confer protection to mice against the pneumococcal lethal challenge. Experiments of passive immunization with sera or purified IgG, derived from animals immunized with PspA5-wP, demonstrated the protective activity of anti-PspA5 IgG in this model. In addition, passive immunization of mice with the IgG fragment responsible for the recognition of the antigen, (Fab)<sup>2</sup>, did not protect the animals against the pneumococcal challenge.

This result indicates the importance of the Fc fragment, responsible by the binding to complement system components. Despite the high levels of anti-PspA5 IgG in mice immunized with the PspA5-wP vaccine, survival was abolished after the depletion of the complement proteins during the challenge. Finally, the BCG vaccine, tested as adjuvant in combination with PspA5, did not alter significantly the response to the antigen. However, prime-boost experiments, using BCG or DTPw combined to PspA5, presented promising results, inducing high levels of anti-PspA5 antibodies and protection against the pneumococcal invasive challenge. These results confirm the potential use of cell vaccines, approved for use in humans, as adjuvants for PspA. In addition, they contribute to the understanding of the adjuvant mechanisms of *B. pertussis* and the mechanisms involved in the protection stimulated by vaccines composed by the PspA antigen.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*. PspA. *Bordetella pertussis*. Vaccines. Antibodies. Complement system.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da proteína PspA de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e seus domínios.....	25
<b>Figura 2</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	48
<b>Figura 3</b> - Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PsA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	49
<b>Figura 4</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	51
<b>Figura 5</b> - Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	52
<b>Figura 6</b> - Perfil eletroforético das diferentes proteínas utilizadas.....	54
<b>Figura 7</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	55
<b>Figura 8</b> - Indução dos subtipos IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PsA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	56
<b>Figura 9</b> - Esquema de interrupção do gene <i>cyaA</i> usando o vetor pFUS2- <i>cya</i> – adaptado de Loch et al., 2004.....	58
<b>Figura 10</b> - Avaliação dos clones de <i>B. pertussis</i> após transformação com o vetor pFUS2- <i>cyaA</i> .....	59
<b>Figura 11</b> - Perfil eletroforético das amostras eluídas da coluna para avaliação da purificação da PT-RE.....	60
<b>Figura 12</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	61
<b>Figura 13</b> - Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a anti- PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	62
<b>Figura 14</b> - Ligação de IgG anti-PspA5 e indução da deposição de complemento na superfície da linhagem de pneumococo ATCC6303.....	64
<b>Figura 15</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	66
<b>Figura 16</b> - Sobrevivência após desafio letal com a linhagem ATCC6303 em animais imunizados passivamente com diferentes IgGs purificadas ou soro de camundongos imunizados com PspA5-wP.....	68
<b>Figura 17</b> - SDS-PAGE das purificações de IgG e do fragmento F(ab') <sub>2</sub> .....	69

<b>Figura 18</b> - Sobrevivência após desafio letal com <i>S. pneumoniae</i> (ATCC6303) em animais submetidos a imunização passiva.....	70
<b>Figura 19</b> - Ligação de IgG e F(ab') <sub>2</sub> e indução de deposição de complemento na superfície do <i>S. pneumoniae</i> .....	71
<b>Figura 20</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	72
<b>Figura 21</b> - Sobrevivência após desafio letal com ATCC6303 em animais submetidos a regime vacinal e tratados com Cobra Venom Fator (CVF).....	73
<b>Figura 22</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	74
<b>Figura 23</b> - Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	75
<b>Figura 24</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	77
<b>Figura 25</b> - Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	78
<b>Figura 26</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	80
<b>Figura 27</b> - Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.....	81
<b>Figura 28</b> - Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)- presentes nos lavados nasais de camundongos imunizados com as diferentes formulações.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Formulações avaliadas neste trabalho.....	37
<b>Tabela 2</b> - Sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante da linhagem atenuada BPLOW.....	50
<b>Tabela 3</b> - Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante da mutante de <i>B. pertussis</i> defectiva para a expressão da PT.....	53
<b>Tabela 4</b> - Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante dos componentes de <i>B. pertussis</i> purificados.....	57
<b>Tabela 5</b> - Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante de PT e OligB.....	62
<b>Tabela 6</b> - Sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens ou BKO ( $\mu$ MT) após o desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação do papel dos anticorpos na proteção induzida pela vacina PspA5-wP.....	67
<b>Tabela 7</b> - Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação do efeito adjuvante da vacina BCG.....	75
<b>Tabela 8</b> - Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com <i>S. pneumoniae</i> ATCC6303. Avaliação do efeito adjuvante das vacinas BCG e DTPw combinadas a PspA5.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

AB<sub>5</sub>: Exotoxinas heterohexaméricas composta por uma subunidade A e um pentâmero de subunidades B.

ACT: Toxina adenilato ciclase

AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico

APC: Célula apresentadora de antígenos

ATP: Adenosina trifosfato

BCG: Vacina celular *Bacillus Calmette-Guérin*

BG: Meio Bordet-Gengou

BKO: Linhagem de camundongos  $\mu\text{MT}^-$

BPDR-RE: PT mutante

BPDR-RE-CyaA<sup>-</sup>: Linhagem derivada de BPDR-RE com interrupção do gene que codifica a ACT.

BPLOW: Linhagem derivada de BPSM com baixa expressão de diferentes fatores de virulência.

BPRA: Linhagem derivada de BPSM defectiva para a expressão de PT.

BPSM: Linhagem de *B. pertussis* derivada de Tohama I, resistente natural à estreptomicina.

BSA: Albumina de Soro Bovino

CD: Célula dendrítica

CT: Toxina colérica produzida por *Vibrio cholerae*

CVF: “Cobra Venom Factor”

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTPa: Vacina trivalente constituída pelos toxóides diftérico, tetânico e proteínas de *B. pertussis*.

DTPw: Vacina trivalente constituída pelos toxóides diftérico, tetânico e a *B. pertussis* inativada.

ELISA: “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”

(Fab')<sub>2</sub>: Fração do anticorpo divalente responsável pela ligação ao antígeno

Fc: Fração do anticorpo responsável pela ligação ao complemento

FHA: Hemaglutinina filamentosa

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Gm: Gentamicina

GST: Glutathione S-transferase

His: Histidina

IgG: Imunoglobulina G

IgG1: Imunoglobulina G subclasse 1

IgG2a: Imunoglobulina G subclasse 2a

IL: Interleucina

i.n.: Intranasal

i.p.: Intraperitoneal  
KLH: “Keyhole Limpet Hemocyanin”  
LPS: Lipopolissacarideo.  
LT: Toxina termo-lábel produzida por *E. coli*  
Nal: Ácido nalidixico  
NR: Antígeno não relacionado  
OligB: Oligômero B da PT.  
PBS: Tampão fosfato-salino  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PCV: Vacina polissacarídica conjugada  
PPV: Vacina polissacarídica  
PRN: Pertactina  
PS: Polissacarídeo capsular  
PspA: Proteína A de superfície de pneumococo  
PT: Toxina pertussis  
PT-RE: Toxina pertussis sem atividade enzimática  
RGD: Arginina-Glicina-Aspartato  
s.c.: Subcutânea  
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio  
Sm28GST: Antígeno de *Schistosoma mansoni* fusionado a glutathione S transferase  
SS: Meio líquido de cultivo para *B. pertussis* – Steiner & Scholte  
Str: Estreptomicina  
S1-S5: Subunidades da PT  
THY: Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura  
TLR: Receptor tipo Toll  
UFC: Unidades Formadoras de Colônia  
wP: Vacina celular *Bordetella pertussis*.  
wPLow: Vacina celular *Bordetella pertussis* com baixa concentração de LPS.  
μMT<sup>-/-</sup>: Linhagem de camundongo que apresenta deficiência na maturação de células B.

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	21
1.1 <u>Proteína A da superfície de pneumococo (PspA) como candidato vacinal</u> .....	23
1.2 <u>Propostas de adjuvantes para PspA – Vacinas celulares</u> .....	27
<b>2 Objetivos</b> .....	32
<b>3 Materiais e métodos</b> .....	33
3.1 <u>Soluções e meios de cultivo</u> .....	33
3.1.1 <u>Soluções</u> .....	33
3.1.2 <u>Meios de cultivo</u> .....	34
3.2 <u>Linhagens bacterianas e cultivo</u> .....	34
3.3 <u>Proteína A da superfície de <i>S. pneumoniae</i>, clado 5 – PspA5</u> .....	35
3.4 <u>SDS PAGE</u> .....	35
3.5 <u>Imunização de camundongos</u> .....	36
3.6 <u>Coleta das amostras</u> .....	39
3.7 <u>Análise da indução de anticorpos anti-PspA5</u> .....	39
3.8 <u>Desafios</u> .....	40
3.8.1 <u>Desafio respiratório letal com <i>S. pneumoniae</i></u> .....	40
3.8.2 <u>Desafio de colonização com <i>S. pneumoniae</i></u> .....	40
3.9 <u>Construção da linhagem BPDR-RE-CyaA<sup>-</sup></u> .....	41
3.9.1 <u>Conjugação da <i>B. pertussis</i> BPDR-RE</u> .....	41
3.9.2 <u>Extração do DNA a partir dos clones selecionados após a conjugação</u> .....	42
3.10 <u>Confirmação da interrupção do gene <i>cyaA</i> nas colônias isoladas por PCR</u> .....	42
3.11 <u>Purificação da toxina pertussis inativada PT-RE</u> .....	43
3.12 <u>Análise da ligação de anticorpos à superfície de <i>S. pneumoniae</i></u> .....	43
3.13 <u>Análise da deposição do componente C3 do complemento à superfície de <i>S. pneumoniae</i></u> .....	44
3.14 <u>Imunização passiva</u> .....	44
3.14.1 <u>Purificação de IgG</u> .....	44
3.14.2 <u>Purificação da fração F(ab')<sub>2</sub> a partir da IgG purificada</u> .....	45
3.14.3 <u>Protocolo de imunização passiva</u> .....	45
3.14.4 <u>Depleção de proteínas do sistema complemento</u> .....	46
3.15 <u>Análises estatísticas</u> .....	46

<b>4 Resultados</b> .....	47
4.1 <u>Caracterização das propriedades adjuvantes de <i>B. pertussis</i> em combinação a PspA5 em camundongos BALB/c</u> .....	47
4.1.1 <i>Comparação do efeito adjuvante dos mutantes de <i>B. pertussis</i> em relação à vacina wP</i> .....	47
4.1.2 <i>Efeito adjuvante de diferentes componentes de <i>B. pertussis</i> quando inoculados em combinação com PspA5 em camundongos BALB/c</i> .....	53
4.1.3 <i>Avaliação da funcionalidade da IgG anti-PspA5 induzida pelas diferentes formulações</i> .....	63
4.2 <u>Avaliação do papel dos anticorpos na proteção induzida pela vacina PspA5-wP</u> .	65
4.2.1 <i>Papel das proteínas de complemento na sobrevivência de camundongos BALB/c contra o desafio letal com a bactéria ATCC6303</i> .....	71
4.3 <u>Caracterização das propriedades adjuvantes da vacina BCG em combinação com PspA5 em camundongos BALB/c.</u> .....	73
<b>5 Discussão</b> .....	83
<b>6 Conclusões</b> .....	92
<b>Referências</b> .....	93

## 1 Introdução

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é uma bactéria gram-positiva encapsulada que em circunstâncias normais mantém um relacionamento comensal com o hospedeiro, mas, eventualmente, pode invadir sítios normalmente estéreis causando doenças como a pneumonia, meningite, bacteremia, otite média e sinusite (Klein, 1981; Weiser, 2010). O pneumococo é considerado como uma das bactérias de maior importância clínica que acomete principalmente crianças, idosos e pacientes em condições médicas crônicas ou imunossuprimidos (O'Brien, Wolfson, 2009). Um dos motivos pelos quais é difícil estabelecer um tratamento efetivo contra a bactéria é o crescimento da resistência a diversos antibióticos, como penicilina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e até mesmo às cefalosporinas de terceira geração (Kim, Song, 2012; Moyo, Steinbakk, 2012).

Mais de 90 sorotipos já foram classificados de acordo com as diferenças na composição química do polissacarídeo que compõe a capsula, e, entre eles, mais de 20 já foram associados a doenças (Dagan, 2009; O'Brien, Wolfson et al., 2009). A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo, auxiliando no escape à fagocitose por células do hospedeiro (Kadioglu, Weiser, 2008). Entretanto, pouca ou nenhuma reatividade cruzada é observada entre os polissacarídeos capsulares.

As vacinas comercialmente disponíveis, constituídas por polissacarídeos capsulares (PS), apresentam limitações como alto custo de produção, limitada cobertura de sorotipos ou baixa imunogenicidade nos grupos com maior risco de adquirir doenças pneumocócicas. A vacina Pneumovax 23 (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ., Brasil), licenciada na década de 80, é composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos. A produção desta vacina é dispendiosa, pois envolve a fermentação das 23 cepas de pneumococo e purificação dos seus polissacarídeos. Além disso, por ser composta por polissacarídeos livres, que não são capazes de ativar respostas de células T, esta vacina não é eficaz em crianças menores de dois anos de idade e apresenta eficácia reduzida em idosos, dois grupos de risco para as doenças pneumocócicas. Em 2000, foi licenciada nos Estados Unidos a primeira vacina conjugada contra pneumococo (Pneumovax-PCV7, Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia, PA), composta por

PS de 7 sorotipos de pneumococo prevalentes nos Estados Unidos, conjugados ao toxóide diftérico CRM197. Por ter um componente proteico, esta vacina induz imunidade em crianças menores de dois anos e em idosos, mas apresenta cobertura limitada que varia de acordo com sorotipos circulantes nas diferentes partes do mundo. A estimativa de cobertura desta vacina, feita em estudos com isolados dos anos 1977 – 1989 e 1990 – 2000, foi de aproximadamente 39% dos sorotipos patogênicos na África, 48% na Ásia e 53.4% na América Latina e o Caribe e 52% para o Brasil. (Brandileone, de Andrade, 2003; Webster, Theodoratou, 2011). Versões novas de vacinas conjugadas, contendo polissacarídeos de 10 ou 13 sorotipos foram recentemente licenciadas em diferentes partes do mundo e aumentam consideravelmente a cobertura contra os sorotipos causadores de doenças (PCV10, Glaxo Smithkline e PCV13, Wyeth Pharmaceuticals). Em 2010, a PCV10 foi introduzida no calendário Brasileiro de imunizações, sendo indicadas 4 doses para crianças a partir dos dois meses de idade. As estimativas de cobertura no Brasil variam entre aproximadamente 60% e 76%, de acordo com o tipo de amostra e faixa etária analisada (Franco, Andrade, 2010; de, Campos, 2011).

Uma vez que o alvo vacinal usado para o combate do pneumococo de forma sorotipo específica é a cápsula, existem dois importantes eventos possíveis de acontecer como efeito da vacinação: 1) troca capsular (do inglês, *capsularswitching*), ocorrendo quando são trocados os genes que codificam para um sorotipo, mediante os processos de transformação e recombinação, por outro tipo capsular (Brueggemann, Pai, 2007). O aspecto mais preocupante na ocorrência deste evento é a troca de um sorotipo vacinal por um não vacinal, já que isto facilita a ocorrência de doenças causadas por sorotipos que “escapam” da vacina. 2) substituição de sorotipo (do inglês, *serotype replacement*), refere-se à diminuição na prevalência de sorotipos que são incluídos na vacina, acompanhada por um aumento correspondente de sorotipos não incluídos na vacina, que preenchem o nicho ecológico primeiramente ocupado pelos sorotipos vacinais (Brueggemann, Pai et al., 2007). Em concordância com isto, atualmente alguns estudos têm demonstrado que após a introdução da vacina PCV7 em diferentes países houve um aumento de doenças causadas por sorotipos não presentes nas vacinas (Weinberger, Malley, 2011; Falup-Pecurariu, 2012). Por este motivo, acredita-se que a substituição dos sorotipos pela pressão seletiva exercida pela imunização poderá ocorrer também com as vacinas compostas por 10 ou 13 polissacarídeos. Recentemente foi publicado

um estudo conduzido no hospital universitário da Universidade de São Paulo que compara a incidência de doenças pneumocócicas invasivas, distribuição e resistência a antibióticos antes (janeiro 2006 – junho 2010) e após (julho 2010 – setembro 2012) a introdução da vacina PCV10 no programa de imunização nacional brasileiro (Dos Santos, Passadore, 2013). A incidência de doenças pneumocócicas invasivas a cada 1000 crianças menores de dois anos apresentou uma redução significativa de 20.30 a 3.97 (80%). Para o grupo de crianças entre os 2 e 15 anos, a redução foi de 2.81 a 0.97 e para o grupo com mais de 15 anos a incidência foi inalterada, de 1.72 a 3.16 casos a cada 1000 indivíduos. Estes dados mostram um efeito significativo da vacinação na redução destas doenças. Entretanto, antes da inclusão da vacina os sorotipos mais frequentemente isolados foram o 14, 5, 6B, 12F e 1 e, após a introdução da vacina, os sorotipos mais frequentemente isolados foram o 7F, 8, 12F e 3. Assim, o trabalho sugere que a mudança da prevalência dos sorotipos pode ser um efeito observado também para a vacina PCV10. Novas alternativas que ajudem a contornar estes problemas não só no Brasil, como no mundo todo são necessárias. Entre elas, o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos proteicos tem sido estudado por diversos grupos (Miyaji, Oliveira, 2013).

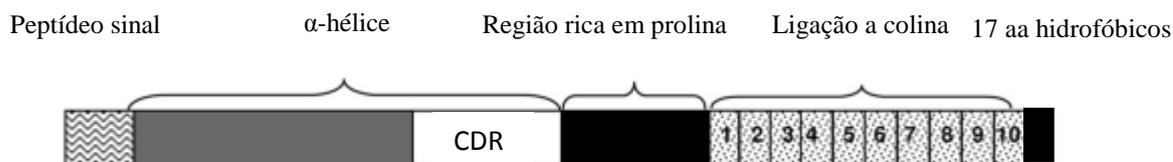
Estudos de possíveis candidatos a antígenos protetores contra o pneumococo têm identificado muitas proteínas que podem ser usadas como componentes vacinais (Tai, 2006; Kadioglu, Weiser et al., 2008; Miyaji, Oliveira et al., 2013). Entre eles, a Proteína A da Superfície de Pneumococo (PspA) é possivelmente a mais estudada.

### 1.1 Proteína A da superfície de pneumococo (PspA) como candidato vacinal

A PspA é constituída por 5 domínios: um peptídeo sinal, um domínio  $\alpha$ -hélice, variável tanto no comprimento como na sequência de aminoácidos, uma região rica em prolina que se prolonga até a parede celular, um domínio de ligação a colina que ancora a proteína à superfície celular e, por último, a cauda C-terminal de 17 aminoácidos hidrofóbicos (Hollingshead, Becker, 2000) (Figura 1). A região N-terminal está exposta na superfície da bactéria e anticorpos produzidos contra esta porção são protetores (McDaniel, Ralph, 1994). Entretanto, esta região apresenta variabilidade antigênica e foi usada por Hollingshead e colaboradores para o agrupamento das moléculas. De acordo

com a similaridade na sequência de aminoácidos da região CDR (do inglês “clade defining region”) presente no final da porção N-terminal, as PspAs foram agrupadas em 6 clados, os quais, por sua vez, foram agrupados em três famílias. A família 1 é composta pelos clados 1 e 2, a família 2 pelos clados 3, 4 e 5 e a família 3 pelo clado 6 (Hollingshead, Becker et al., 2000). A distribuição de PspA nos isolados de pneumococo de diferentes partes do mundo é similar, sendo que aproximadamente 50% dos isolados expressam PspAs da família 1 e 50% expressam PspAs da família 2. Os PspAs da família 3 estão raramente presentes (Vela Coral, Fonseca, 2001; Brandileone, Andrade, 2004; Hollingshead, Baril, 2006; Pimenta, Ribeiro-Dias, 2006). Em geral, anticorpos produzidos contra PspA são capazes de reconhecer moléculas da mesma família (Tart, McDaniel, 1996), sugerindo que composições vacinais compostas por um PspA da família 1 e um PspA da família 2 seriam potencialmente capazes de proteger contra a grande maioria de isolados de pneumococo. Mais recentemente, foram isoladas duas moléculas de PspA, uma do clado 4 e outra do clado 5, que foram capazes de induzir anticorpos com reatividade abrangente, que reconhecem PspAs de famílias heterólogas, expressos por diferentes isolados de pneumococo (Darrieux, Moreno, 2008; Moreno, Oliveira, 2010). Estas observações têm grande importância para o desenvolvimento de vacinas compostas por PspA, já que análises de sequenciamento de mais de 200 isolados mostraram a plasticidade do genoma da bactéria em resposta a pressões do sistema imune e intervenções clínicas, como o uso de antibióticos e vacinas. Estes estudos apontam o locus do *pspA* como uma região de altos índices de recombinação, sugerindo que mutações podem surgir após a introdução de vacinas baseadas neste antígeno (Croucher, Harris, 2011).

Um dos mecanismos pelo qual a PspA participa na virulência do pneumococo é a capacidade de se ligar à apolactoferrina presente nas secreções de mucosas, inibindo assim, sua atividade bactericida (Shaper, Hollingshead, 2004). Além disso, a expressão da PspA na superfície do pneumococo inibe a deposição do componente C3b na bactéria, facilitando o escape do sistema imune (Tu, Fulgham, 1999; Ren, McCrory, 2004). Anticorpos anti-PspA são capazes de reverter a inibição da deposição do complemento (Ren, Szalai, 2004), mediando, desta forma a opsonização e fagocitose (Ren, Li, 2012).



Adaptado de (Moreno, Oliveira et al., 2010)

**Figura 1.** Representação esquemática da proteína PspA de *Streptococcus pneumoniae* e seus domínios.

PspA tem sido amplamente estudada como candidato vacinal. Diferentes formulações vacinais baseadas em PspA se mostraram eficazes em modelos animais de infecção pneumocócica. Estas estratégias vacinais incluem sistemas de entrega e apresentação de antígenos, combinações com adjuvantes e diferentes vias de inoculação (Miyaji, Oliveira et al., 2013). Em um estudo recente, nanopartículas constituídas por polianidrido foram usadas para encapsular PspA. A proteína encapsulada preservou a capacidade de ligação à apolactoferrina e inibição de sua atividade bactericida. Este sistema, quando administrado em camundongos pela via subcutânea, foi capaz de estimular altos níveis de anticorpos anti-PspA com alta avidéz no reconhecimento do antígeno. (Haughney, Petersen, 2013). Em uma estratégia similar PspA foi encapsulado em nano-gel e administrado por via nasal em camundongos (Kong, Sato, 2013). A imunização foi capaz de induzir altos níveis de IgG anti-PspA circulantes e IgA anti-PspA no trato respiratório dos animais. Esta vacina conferiu proteção dos camundongos contra um desafio letal com *S. pneumoniae*.

Estudos com vacina de DNA e adjuvantes combinados a PspA recombinante foram importantes para determinar a qualidade da resposta imune efetora. Vacinas de DNA expressando PspA, apesar de não induzirem níveis de anticorpos tão altos quanto a PspA recombinante combinada ao adjuvante hidróxido de alumínio, são capazes de direcionar a resposta imune para o tipo Th1, com uma proporção equilibrada dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, além da secreção de IFN- $\gamma$ . A presença de IgG2a no soro favorece a deposição de complemento na superfície da bactéria em ensaios *in vitro* e, esta resposta é mais eficaz na proteção contra modelos de desafio invasivos e de

colonização por *S. pneumoniae* em camundongos (Ferreira, Darrieux, 2008; Ferreira, Oliveira, 2010). Da mesma forma, o uso de vetores vivos, como linhagens de *Salmonella* e de bactérias ácido-lácticas, para a apresentação de PspA em ensaios de imunização em camundongos, podem direcionar a resposta imune para o tipo Th1, com secreção de IFN- $\gamma$ . Estas estratégias têm ainda em comum a vantagem de induzirem resposta imune de mucosa (Kang, Srinivasan, 2002; Hanniffy, Carter, 2007; Ferreira, Darrieux, 2009; Li, Wang, 2009; Xin, Li, 2009). Em *Salmonella*, também foram expressas proteínas de fusão compostas por porções N-terminais de PspAs das famílias 1 e 2. Estas construções, quando utilizadas para imunização de camundongos BALB/c por via oral, foram capazes de gerar resposta imune contra PspAs heterólogos, estendendo a proteção dos animais contra desafios com diferentes linhagens de pneumococo (Xin, Li et al., 2009). Resultados semelhantes, com indução de altos níveis de anticorpos e resposta do tipo Th1, podem ser alcançados com o uso de adjuvantes específicos. A imunização de camundongos com PspA em combinação com a citocina IL-12 por via nasal, foi capaz de induzir níveis mais altos de IgG1, IgG2a e IgA anti-PspA do que a proteína sozinha. O soro dos animais imunizados com PspA combinado a IL-12 levou a um aumento da deposição de complemento na superfície da bactéria, *in vitro*, e fagocitose por macrófagos em cultura. A purificação dos componentes deste soro mostrou que este efeito é devido principalmente à presença de IgG2a anti-PspA (Arulanandam, Lynch, 2001). Diferentes agonistas de receptores de reconhecimento padrão (do inglês “*Toll-like receptors* – TLR”) também foram testados como adjuvantes em combinação a PspA. A imunização de camundongos por via nasal com estas formulações foi capaz de diminuir a colonização do trato respiratório superior e inferior dos animais por pneumococo (Arulanandam, Lynch et al., 2001; Oma, Zhao, 2009).

Assim, a indução de altos níveis de anticorpos e o direcionamento da resposta para o tipo Th1 são características que devem ser buscadas durante o desenvolvimento de vacinas baseadas em PspA. Vacinas bacterianas atenuadas ou inativadas, como a vacina celular pertussis (wP) ou a vacina BCG (*Bacillus Calmet-Guérin*) possuem atividades adjuvantes intrínsecas que podem direcionar a resposta imune a antígenos combinados.

## 1.2 Propostas de adjuvantes para PspA – Vacinas celulares

A pesquisa em adjuvantes é um elemento crucial no desenvolvimento de vacinas. Sais de alumínio (Alum) são eficazes em formulações com proteínas recombinantes a serem aplicadas em condições onde respostas Th2 são desejadas. Entretanto, vários grupos têm se concentrado em descrever novos adjuvantes para aplicações onde respostas mediadas por células são mais eficazes (Reed, Bertholet, 2009). Tais respostas são geralmente induzidas por vacinas celulares (Mahon, Ryan, 1996; Berstad, Andersen, 2000; McGuirk and Mills, 2000; Higgins, Jarnicki, 2006), como é o caso da vacina celular pertussis (wP). Esta vacina é administrada em crianças na composição da DTPw (vacina tríplice que contém toxóide diftérico, toxóide tetânico e *Bordetella pertussis* inativada (wP) em suspensão, tendo como adjuvante hidróxido de alumínio) no Brasil, e em países em desenvolvimento. Em muitos países desenvolvidos, devido a ocorrência de efeitos colaterais decorrentes da vacinação com wP, a DTP atualmente utilizada é composta pela vacina pertussis acelular (DTPa) que contém componentes proteicos da bactéria (Locht and Mielcarek, 2012).

Estudos em animais mostraram as propriedades adjuvantes da vacina DTPw quando combinada a outras vacinas, como por exemplo, a vacina contra influenza A (Potter, Tamizifar, 1995; Tamizifar, Jennings, 1997; Prikazsky and Bock, 2001). Em crianças, um estudo conduzido na Eslováquia, mostrou que a combinação da DTPw com a vacina contra Hepatite B (HBV) elevou os níveis de anticorpos anti-HBV em relação à administração da HBV sozinha, provavelmente pela ação adjuvante da wP (Prikazsky and Bock, 2001). Em um ensaio clínico conduzido em crianças de Israel, Dagan e colaboradores mostraram a diminuição dos níveis de anticorpos contra polissacarídeos de uma vacina pneumocócica conjugada 11-valente quando combinada a DTPa. Este prejuízo à resposta dos polissacarídeos da vacina pneumocócica não foi observado quando a DTPw foi utilizada na combinação (Dagan, Goldblatt, 2004).

O aumento dos casos de pertussis nos últimos anos, principalmente em países em desenvolvimento, têm levantado discussões sobre a eficácia das vacinas pertussis acelulares. As estratégias mais rápidas para contornar este problema constituem na vacinação de adolescentes ou adultos, que podem ser carreadores da bactéria e assim

transmiti-las aos recém-nascidos ainda não protegidos pela vacina. Outra estratégia é a vacinação de grávidas visando a transmissão de anticorpos maternos, garantindo a proteção de bebês que ainda não receberam as primeiras doses da vacina (Meade, Plotkin, 2014). Por outro lado, diversos grupos têm estudado propostas de novas vacinas ou vias de inoculação alternativas para as vacinas wP, como a via nasal. Em humanos voluntários, a inoculação de wP por via nasal, se mostrou eficaz para a indução de anticorpos e de resposta de células T específicas contra pertussis (Berstad, Holst, 2000; Berstad, Oftung, 2000). Em camundongos, foi demonstrada a atividade adjuvante da wP administrada por via nasal em combinação com uma vacina de influenza inativada. Esta combinação foi capaz de induzir níveis significativamente mais altos de anticorpos contra o vírus do que a vacina influenza sozinha (Berstad, Andersen et al., 2000).

Recentemente, nosso grupo testou a atividade adjuvante das vacinas wP e wP<sub>low</sub> - uma vacina de nova geração, desenvolvida pelo Instituto Butantan, na qual o excesso de LPS foi removido e que foi testada em ensaios clínicos de fase 1 (Zorzeto, Higashi, 2009) - em combinação a PspA recombinante por via nasal em camundongos. As vacinas combinadas foram capazes de proteger camundongos contra desafios letais respiratórios e também contra desafios de colonização (Oliveira, Miyaji, 2010). Ambas as vacinas PspA-wP e PspA-wP<sub>low</sub> induziram altos níveis de anticorpos anti-PspA sistêmicos e de mucosa e não foram observadas diferenças significativas na qualidade da resposta imune. Além disso, a proteção induzida pela vacina PspA-wP foi também observada em camundongos C3H/HeJ, que não possuem a sinalização por LPS, via receptor TLR4. Assim, o LPS não parece ser o componente chave da atividade adjuvante de *B. pertussis* neste modelo. Além da ação adjuvante observada pela via nasal neste modelo, foi testada também a ação adjuvante da DTP<sub>low</sub> quando combinada a PspA pela via subcutânea em camundongos. A vacina PspA-DTP<sub>low</sub> também foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos anti-PspA e proteger contra desafios respiratórios invasivos com duas linhagens de pneumococo (Oliveira, Miyaji et al., 2010). Estes resultados sugerem que a inoculação da vacina não precisa ser necessariamente por via de mucosa para proteção contra o desafio respiratório invasivo por pneumococo.

Entre os componentes de *B. pertussis*, as toxinas pertussis (PT) e adenilato ciclase (ACT) e a hemaglutinina filamentosa (FHA) são alguns dos possíveis candidatos a adjuvantes em combinação a PspA no modelo avaliado pelo nosso grupo. A PT é uma

exotoxina e importante fator de virulência produzida exclusivamente por *B. pertussis*. Esta exotoxina é constituída por 5 subunidades (S1-S5) com uma configuração AB<sub>5</sub>. A subunidade tóxica da PT, também chamada de protômero A, é composta pela S1, enquanto que a subunidade B ou oligômero B (OligB), que forma um anel em pentâmero, é composta pelas subunidades S2, S3, S4 (duas moléculas) e S5. O mecanismo de ação da toxina consiste na sua ligação inicial, mediante a subunidade B pentamérica, às glicoproteínas contendo ácido siálico que se encontram na superfície da célula alvo, seguida pela internalização da proteína. Na porção intracelular, a subunidade A se dissocia do oligômero B. Esta subunidade tem atividade de ADP-ribosilase e leva à transferência de um grupo ADP-ribose do NAD<sup>+</sup> para um resíduo de cisteína da proteína G inibitória (Gi). Isto resulta na permanência da proteína Gi na forma inativa, sendo incapaz de inibir a atividade da enzima adenilato ciclase. Como consequência, há o aumento do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPC) e a alteração de vias de sinalização celular. Um dos efeitos conhecidos desta ação de PT é a inibição da resposta imune contra a bactéria. (Locht, Coutte, 2011; Melvin, Scheller, 2014).

As propriedades adjuvantes de PT e de derivados geneticamente inativados já foram demonstradas contra diferentes antígenos, como, por exemplo, FHA e a hemocianina KLH (do inglês Keyhole limpet hemocyanin” comumente usada também como carreador de antígenos). Os estudos demonstram que ambas as formas enzimaticamente ativas ou inativadas de PT são capazes de potencializar respostas Th1 e Th2 contra os antígenos associados. Estes estudos demonstram a estimulação de secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2 por células T e IL-1 por macrófagos. Além disso a PT foi capaz de aumentar a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células B, macrófagos e linfócitos T (Ryan, McCarthy, 1998). Estudos mais recentes mostram que a ação adjuvante de PT envolve estimulação e maturação de células apresentadoras de antígenos (APC) e ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Murphey, Chang, 2011).

A ACT codificada pelo gene *cyaA*, é considerada também como um importante fator de virulência da *B. pertussis* e consiste em dois domínios. O primeiro, presente na porção N-terminal da molécula, é o domínio de adenilato ciclase dependente de calmodulina, responsável pela conversão de ATP em AMP cíclico. O segundo é um domínio RTX (do inglês “repeat in toxin”) que medeia a ligação a células alvo e forma poros nas membranas, provocando lise das células. Apesar da ACT poder agir em

diferentes tipos celulares, ela apresenta alta afinidade pelo receptor de complemento 3 (CR3) que está presente em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, modulando as suas atividades (Melvin, Scheller et al., 2014). Assim como demonstrado para PT, ambas as formas ativas e inativas de ACT (em relação à atividade de adenilato ciclase) apresentam atividade adjuvante, induzindo a produção de anticorpos contra antígenos associados como Ovalbumina, PT, FHA ou pertactina (PRN), quando inoculados pelas vias intraperitoneal ou nasal em modelo murino (Macdonald-Fyall, Xing, 2004; Orr, Douce, 2007). Em ambos os estudos, a forma enzimaticamente inativa apresentou atividade adjuvante superior.

A proteína mais abundante de *B. pertussis*, FHA, que está presente na superfície da bactéria, podendo também ser secretada, é uma proteína monomérica com uma estrutura filamentosa que participa na adesão da bactéria às células eucarióticas. FHA contém três diferentes domínios: um domínio de ligação a carboidratos, outro de ligação a glicosaminoglicanos e um domínio RGD (arginina-glicina-aspartato) que está envolvido na ligação a receptores tipo integrina presentes em leucócitos (Melvin, Scheller et al., 2014). Um estudo recente mostra que FHA tem a capacidade de induzir maturação de células dendríticas humanas *in vitro* e secreção de citocinas como IL-10, IL-12, IL-6 e IL-23 (Dirix, Mielcarek, 2014). As propriedades adjuvantes de FHA contra antígenos associados já foram demonstradas pela combinação com a glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma mansoni* (Sm28GST) ou com a hemocianina KLH, quando inoculadas por via nasal, oral, ou subcutânea, em sistemas incorporados a lipossomas ou livres. Em todos os casos, foi observada a indução aumentada de anticorpos sistêmicos e de mucosa contra os antígenos, na presença de FHA (Poulain-Godefroy, Mielcarek, 1998; Poulain-Godefroy, Menozzi, 2003).

A vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), usada no combate à tuberculose, é uma vacina composta pela bactéria *Mycobacterium bovis* atenuada através de sucessivas passagens em cultura. Apesar de ser composta por uma bactéria inteira, como a wP, a BCG é administrada na forma viva. Esta vacina é, provavelmente, a mais usada no mundo todo, sendo recomendada para uso humano a partir do nascimento (Locht, 2008). No Brasil, a BCG é administrada nas crianças em dose única no momento do nascimento. Pelas propriedades adjuvantes e segurança, várias estratégias de combinação de antígenos a BCG têm sido testadas com sucesso. Em recém-nascidos

brasileiros, a vacina BCG combinada ao antígeno do vírus da Hepatite B (HBsAg) foi avaliada em ensaios clínicos de imunogenicidade e segurança, com bons resultados (Carniel, Morcillo, 2008).

Em modelos animais, a administração concomitante de BCG a uma vacina conjugada contra *Neisseria meningitidis*, (MenC-CRM197) em camundongos neonatos pela via subcutânea, estimulou uma maior produção de anticorpos IgG contra o polissacarídeo C de *N. meningitidis*. Além disso, foi observado um aumento na atividade bactericida do soro dos animais que receberam as duas vacinas. (Brynjolfsson, Bjarnarson, 2011). Em outro estudo, a administração de BCG em combinação a uma vacina inativada contra *Leishmania* (KLV), em camundongos BALB/c, diminuiu tanto o tamanho das lesões da pele como a média do número de amastigotos encontrados nos macrófagos, com relação às lesões e a proliferação de amastigotos observada nos animais tratados com KLV ou BCG. (Nahrevanian, Jafary, 2013).

Este trabalho é uma continuação dos estudos do grupo, através da caracterização dos componentes de *B. pertussis* que exercem a função adjuvante quando combinados a PspA e a caracterização da resposta imune efetora induzida pela formulação PspA5-wP. Além disso, os estudos foram estendidos para a análise da atividade adjuvante da vacina BCG quando combinada a PspA.

## 2 Objetivos

Os objetivos propostos para o desenvolvimento deste trabalho foram:

A caracterização das bases moleculares da atividade adjuvante de *B. pertussis* em combinação com antígenos de pneumococo em camundongos, através do uso de mutantes de *B. pertussis*, defectivos para expressão de fatores de virulência, e de componentes purificados.

Avaliação do papel dos anticorpos e do sistema complemento na proteção induzida pela formulação PspA5-wP contra o desafio invasivo com *S. pneumoniae*.

Avaliação da propriedade adjuvante da vacina BCG em combinação ao antígeno PspA5.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Soluções e meios de cultivo

##### 3.1.1 *Soluções*

- Solução tampão Tris-glicina: Tris base 0,3 %, glicina 1,88 % e SDS 0,1 % pH 8,3.
- Solução tampão de amostra para SDS-PAGE: Tris-HCl 1M pH 6,8, SDS 1 %, Azul de Bromofenol 0,05 %, glicerol 5 % e  $\beta$ -mercaptoetanol 1,43 M.
- Solução tampão de amostra para SDS-PAGE sem  $\beta$ -mercaptoetanol: Tris-HCl 1M pH 6,8, SDS 1 %, Azul de Bromofenol 0,05 % e glicerol 5 %.
- Solução corante de SDS-PAGE: “*Comassie Blue Brilliant*” 0,25 %, etanol 40 % e ácido acético 10 %.
- Solução descorante de SDS-PAGE: Etanol 30 % e ácido acético 10 %.
- PBS (Solução tampão salina fosfato) 10X: NaCl 1,37 M, KCl 27 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14 mM pH 7,4.
- PBS-T: PBS 1X e Tween ® 20 a 0,1 %.
- Solução tampão carbonato-bicarbonato: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM e NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, ajustado para pH 9,6.
- Solução tampão citrato-fosfato: Citrato de sódio 100 mM e fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 300 mM pH 5,0.
- Solução tampão Tris-glicina 5x: Tris base 1,5 %, glicina 9,4 % e SDS 0,5 % pH 8,3.
- Solução tampão de ligação dos anticorpos à coluna HiTrap™ - proteína G: 20 mM fosfato de sódio pH 7,0.
- Solução tampão de eluição dos anticorpos aderidos à coluna HiTrap™ – proteína G: Glicina-HCl 0,1 M pH 2,7.
- Solução tampão para neutralização do pH da solução que contém os anticorpos eluídos: Tris-HCl 1M pH 9,0.
- Solução de equilíbrio da resina Affi-gel® Blue (Bio-Rad): Solução tampão fosfato 0,1 M pH 6,0
- Solução de lavagem da resina Affi-gel® Blue (Bio-Rad) Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

- Solução tampão de eluição da PT-RE: Tris-HCl 50 mM e MgCl<sub>2</sub> 0,75 M pH 7,4.

### 3.1.2 Meios de cultivo

- Meio líquido THY: Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5 % de extrato de levedura.
- Meio ágar sangue sólido: Meio Tryptic Soy ágar com 5 % de sangue de carneiro (v/v).
- Meio líquido de cultivo para *B. pertussis* Steiner & Scholte (SS) preparado de acordo com o descrito na literatura (Stainer, 1971).
- Meio sólido de cultivo para *B. pertussis*: meio Bordet-Gengou (Difco) contendo 1 % de glicerol e 20 % de sangue de carneiro.

### 3.2 Linhagens bacterianas e cultivo

As linhagens de *S. pneumoniae* ATCC6303 (sorotipo 3, PspA clado 5) e 0603 (sorotipo 6B, PspA clado 1) foram cultivadas em meio líquido THY, a 37 °C, sem agitação. As bactérias foram sempre passadas em placas de ágar sangue e cultivadas por aproximadamente 18 h, a 37 °C, antes da inoculação em THY. Os estoques foram mantidos a -80 °C em THY contendo 20 % de glicerol. As linhagens de *B. pertussis* parental (BPSM) e mutantes (BPLOW e BPRA) provenientes do laboratório da Dra Nathalie Mielcarek, do Instituto Pasteur de Lille foram derivadas da *B. pertussis* Tohama I e estão descritas na Tabela 1. Todas estas linhagens foram cultivadas em meio Bordet-Gengou (BG) agar (Difco) suplementados com 1 % de glicerol, 20 % de sangue de carneiro e 100 µg/ml estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As bactérias foram suspensas em PBS e inativadas em 0.2 % formaldeído por 24 h a 35 °C (protocolo escolhido de acordo com a produção da vacina wP produzida no Instituto Butantan). Estas linhagens já foram enviadas na forma inativada para o Brasil. A linhagem de *B. pertussis*, BPDR-RE, proveniente do mesmo laboratório francês é deficiente para produção de hemaglutinina filamentosa (FHA) e produz a toxina pertussis (PT) enzimaticamente inativa (PT-RE) (Lobet, Feron, 1993) pelas mutações no gene *ptx* que levaram à substituição da arginina e do ácido glutâmico, localizados nas

posições 13 e 129 respectivamente, por resíduos de leucina (R13L) e de glicina (E129G). A partir desta linhagem (BPDR-RE) foi construída a linhagem BPDR-RE CyaA<sup>-</sup>, defectiva também para produção da toxina adenilato ciclase pela interrupção do gene que a codifica, *cyaA*. As bactérias foram semeadas em placas de BG sangue e cultivadas por aproximadamente 18 h, a 37 °C, antes de serem inoculadas no meio Stainer & Scholte (SS) complementado com estreptomicina ((Str) na concentração final de 100 µg/mL) e, no caso da linhagem BDPR-RE-CyaA<sup>-</sup> o meio foi complementado com gentamicina ((Gm) na concentração final de 10 µg/mL). Estoques das linhagens foram mantidos a -80 °C em meio SS contendo 20 % de glicerol.

### 3.3 Proteína A da superfície de *S. pneumoniae*, clado 5 – PspA5

O antígeno empregado neste trabalho é o fragmento N- terminal da proteína PspA do clado 5 (PspA5), que induz anticorpos com reatividade cruzada contra PspAs de diferentes cladros (Darrieux, Moreno et al., 2008). O fragmento que codifica a região N-terminal de PspA5 foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico da linhagem de pneumococo 122/02 (da coleção do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil) e clonado no vetor plasmidial pAE, em trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório (Ferreira, Darrieux et al., 2009). Este vetor permite a expressão da proteína heteróloga com uma cauda adicional de 6 resíduos de histidina (6XHis) na extremidade N-terminal, a fim de facilitar a sua purificação por cromatografia em resina quelante, previamente carregada com Ni<sup>2+</sup> (Ramos, Abreu, 2004).

### 3.4 SDS PAGE

O gel de SDS-poliacrilamida, Mini-PROTEAN® TGX™ (Tris Glycine eXtended) (BIO-RAD) com gradiente de 4 a 20 % foi utilizado na eletroforese para determinar o perfil e pureza das proteínas PT, ACT, FHA e PspA5. Para determinar o perfil de purificação da IgG anti-PspA5, da fração F(ab')<sub>2</sub> ou da proteína PT inativada, foram realizadas eletroforeses em gel de SDS-poliacrilamida com 8, 12 ou 15 % de concentração de acrilamida, conforme indicado em cada experimento. As corridas foram realizadas em tampão Tris-glicina 1X a 120 V por 2,5 h. Em seguida, os géis

foram corados com Solução corante de SDS-PAGE e descorados com Solução Descorante de SDS-PAGE.

### 3.5 Imunização de camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas, “Specific Pathogen Free”, com 5 a 8 semanas de idade, criados pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram usados para a realização de diferentes ensaios propostos neste trabalho. Para a avaliação do papel dos anticorpos na proteção estimulada pela vacina PspA5-wP, foram utilizados camundongos knockout para a produção de células B maduras (linhagem  $\mu$ MT, aqui nomeados de BKO), produzidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (USP), e a linhagem parental C57BL/6. Em ambos os casos foram utilizados animais machos e fêmeas, de 5 a 8 semanas de idade. Os protocolos de experimentação em animais descritos neste projeto foram aprovados pelo comitê de Ética no uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – protocolo número 824/11). Antes da formulação das vacinas, o excesso de LPS proveniente de *E. coli*, presente nas preparações de PspA5, foi removido por extração com triton X-114, como descrito anteriormente (Aida and Pabst, 1990). Para o modelo de desafio letal, a imunização foi realizada em grupos de 4 a 6 camundongos BALB/c, C57Bl/6 ou BKO. Cada dose de vacina foi composta por 5  $\mu$ g de PspA5 sozinha ou na presença de 1/8 da dose humana wP (que corresponde a  $7 \times 10^8$  células inativadas) ou quantidades equivalentes da linhagem BPSM e das mutantes de *B. pertussis* (BPLOW e BPRA) inativadas. A imunização nasal (i.n.) foi conduzida em camundongos previamente anestesiados pela via intraperitoneal (i.p.) com uma mistura de 0,4 mg (20 mg/kg) de xilazina e 1 mg (50 mg/kg) de quetamina. Ensaios prévios foram realizados para estabelecer o número de doses que permitissem visualizar diferenças na produção de anticorpos induzidos pelas diferentes formulações em combinação com PspA5. O protocolo de imunização estabelecido para a caracterização das propriedades adjuvantes da *B. pertussis* foi de uma única dose nasal das diferentes formulações em volume de 10  $\mu$ L. Para avaliação do papel dos anticorpos na proteção dos animais, foi utilizado um protocolo de seis doses com a formulação PspA5-wP, que sabidamente estimula altas concentrações de IgG sérico anti-PspA5 em animais selvagens (Oliveira, Miyaji et al., 2010). As doses foram administradas nos dias 0, 3, 14, 17, 28 e 31. Em todos os

experimentos, grupos controles receberam apenas os adjuvantes, o antígeno ou não foram imunizados. Para a avaliação dos componentes purificados, a toxina pertussis (PT), a adenilato ciclase (ACT), a hemaglutinina filamentosa (FHA) e o oligômero B (OligB) foram adquiridos das empresas Sigma ou The Native Antigen (Cherwell, Oxfordshire, United Kingdom) e foram utilizadas na quantidade de 1 µg por dose em combinação com 5 µg de PspA5, seguindo o protocolo de uma dose. No caso do OligB foi usada a quantidade correspondente em massa molar em relação a 1 µg da PT (0,75 µg). A vacina BCG foi produzida pela FAP (Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a DTPw pelo instituto Butantan. A dose usada para avaliação das propriedades adjuvantes das vacinas BCG ou DTPw, consistiu em 1 µg ou 5 µg da proteína PspA5 em presença ou não de 1 dose humana da vacina BCG (que corresponde a aproximadamente  $10^5$  bactérias) ou de 1/8 da dose humana da vacina DTPw, administradas pela via subcutânea (s.c.). O esquema de imunização consistiu em uma dose em volume final de 200 µL. Em todos os experimentos, grupos controles receberam apenas os adjuvantes, o antígeno ou não foram imunizados.

A tabela 1 resume as formulações avaliadas:

**Tabela 1.** Formulações avaliadas neste trabalho

<b>Formulações</b>	<b>Descrição</b>	<b>Dose</b>	<b>Via</b>
PspA5-wP	PspA5: Proteína A da Superfície de pneumococo, clado 5. wP: Vacina celular pertussis produzida no Instituto Butantan. Derivada da linhagem NIH137	wP: 1/8 da dose humana, correspondentes a $7 \times 10^8$ bactérias inativadas por dose. PspA5: 5 µg por dose.	nasal
PspA5-BPLOW PspA5-BPRA e PspA5-BPSM	PspA5 em combinação a: BPSM: Derivada da linhagem Tohama I, resistente natural a	<i>B. pertussis</i> : $7 \times 10^8$ bactérias inativadas por	nasal

	<p>estreptomicina. Linhagem parental das mutantes BPLOW e BPRA</p> <p>BPLOW: Apresenta deleções no gene <i>bvgA</i> e parte do gene <i>bvgS</i>, que resultam em baixa expressão de diferentes fatores de virulência, entre eles a PT e FHA.</p> <p>BPRA: Apresenta deleção do gene <i>ptx</i>, sendo, portanto defectiva para a expressão de PT</p>	<p>dose</p> <p>PspA5: 5µg por dose.</p>	
<p>PspA5-PT</p> <p>PspA5-ACT</p> <p>PspA5-FHA</p> <p>PspA5-OligB</p>	<p>PspA5 em combinação a:</p> <p>PT: toxina pertussis</p> <p>ACT: toxina adenilato ciclase</p> <p>FHA: Hemaglutinina filamentosa</p> <p>OligB: oligômero B</p>	<p>Proteínas de <i>B. pertussis</i> FHA, ACT e PT: 1µg por dose.</p> <p>OligB: 0,75 µg</p> <p>PspA5: 5µg por dose</p>	<p>nasal</p>
<p>PspA5-BCG</p> <p>PspA5-DTPw</p>	<p>PspA5 em combinação a:</p> <p>BCG: Vacina celular <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>.</p> <p>DTP: Vacina trivalente constituída pelos toxóides diftérico, tetânico e a <i>B. pertussis</i> inativada.</p>	<p>BCG: 1 dose humana, correspondentes a <math>1 \times 10^5</math></p> <p>DTPw: 1/8 dose humana</p> <p>PspA5: 1 µg ou 5 µg por dose.</p>	<p>Subcutânea</p>

### 3.6 Coleta das amostras

O sangue foi coletado 20 dias após a imunização dos animais por punção no plexo venoso retro-orbital. As amostras foram mantidas a 37 °C por 30 min e centrifugadas a 376 g por 10 min. O soro obtido foi mantido a -20 °C até o uso. Para a coleta dos lavados nasais, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de uretano (60 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de quetamina) por via intraperitoneal. Através de uma incisão na traqueia dos camundongos, foram injetados 200 µL de solução salina e o volume passado pelas narinas foi coletado em micro tubos. Este procedimento foi repetido com mais 200 µL e as duas coletas foram misturadas.

### 3.7 Análise da indução de anticorpos anti-PspA5

Para verificar os níveis de anticorpos nos soros dos animais foi utilizado o método de ELISA. Placas de poliestireno de 96 cavidades (Maxisorp-Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos) foram sensibilizadas por 18 h a 4 °C com 1 µg/mL da proteína recombinante PspA5, diluída em tampão carbonato bicarbonato. Como referência para calcular as concentrações de anticorpo foram utilizadas curvas padrão de IgG, IgG1 ou IgG2a (Southern Biotech, Birmingham, AL, Estados Unidos), de acordo com cada experimento e com a amostra a ser analisada. As placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas com uma solução de 10 % de leite desnatado em PBS-T. Após incubação a 37 °C por 1 h, as placas foram novamente lavadas e as amostras de soro diluídas seriadamente em PBS-T contendo 1 % de BSA. As placas foram incubadas por 1 h e 30 min em estufa a 37 °C. Posteriormente as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo produzido em cabras (Southern Biotech), por 1 h a 37 °C. Após lavagens, adicionou-se um anticorpo anti-IgG de cabras conjugado a peroxidase (Southern Biotech) e a reação foi revelada pela adição de solução de 10 mg de o-phenilenediamina (OPD, Sigma Aldrich) em 20 mL de tampão citrato fosfato, contendo 10 µL de água oxigenada. A reação foi parada pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M por cavidade. A absorbância foi registrada mediante o uso do leitor de ELISA (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) a 492 nm. A

determinação da concentração dos anticorpos foi realizada com base nas curvas de concentração aplicadas nas placas.

### 3.8 Desafios

#### 3.8.1 *Desafio respiratório letal com S. pneumoniae*

A cepa de *S. pneumoniae* ATCC6303 foi cultivada em meio THY líquido até atingir a fase exponencial ( $OD_{600nm}=0.4$ ). As bactérias foram centrifugadas a 1500 g, por 20 min e suspensas em 1:10 do volume inicial, em meio contendo 15 % de glicerol. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram mantidas a  $-80$  °C. Após o congelamento, um dos tubos foi descongelado e diluições foram plaqueadas em ágar-sangue, para a análise da viabilidade celular. As alíquotas podem ser mantidas a  $-80$  °C por meses. Sempre que necessário, a viabilidade celular é testada novamente. Vinte e um dias após a imunização, os animais foram anestesiados por via i.p. com uma mistura de 0,4 mg (20 mg/kg) de xilazina e 2 mg (100 mg/kg) de quetamina e receberam por via nasal 50  $\mu$ L de uma suspensão contendo  $3 \times 10^5$  bactérias. A sobrevivência dos animais foi acompanhada por 10 dias. Neste desafio, os animais adoecem em aproximadamente 30 h e morrem entre 72 h e 120 h. Após 120 h (5 dias), os animais em geral superam a doença e sobrevivem ao desafio (Ferreira, Oliveira et al., 2010).

#### 3.8.2 *Desafio de colonização com S. pneumoniae*

Vinte e um dias após a última imunização foi realizado um desafio de colonização nos camundongos C57Bl/6 utilizando a linhagem de *S. pneumoniae* 0603, (sorotipo 6B, PspA1). Para tanto, os estoques foram preparados conforme descrito no item anterior. Os animais foram anestesiados com uma mistura de 0,4 mg (20 mg/kg) de xilazina e 1 mg (50 mg/kg) de quetamina, por via i.p. e então foram inoculadas  $5 \times 10^6$  bactérias suspensas em 10  $\mu$ L de salina em ambas as narinas dos camundongos. Após 5 dias, os animais foram eutanasiados e coletou-se os lavados nasais conforme descrito no item 3.6. Diluições seriadas dos lavados nasais foram plaqueadas em ágar sangue

contendo 4 µg gentamicina/mL e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para a contagem de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias).

### 3.9 Construção da linhagem BPDR-RE-CyaA

Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório da Dra Nathalie Mielcarek, no Instituto Pasteur de Lille, na França. Para a construção desta linhagem foi usado um vetor suicida, pFUS2, desenhado por Antoine e sua equipe (Antoine, Alonso, 2000) para a identificação de potenciais genes de virulência de *B. pertussis*. Este vetor, contendo uma serie de sítios de restrição únicos, foi desenhado para uma rápida inativação do gene alvo através de geração de fusões de transcrição com o gene repórter *lacZ*. Uma porção do gene da toxina adenilato ciclase (*cyaA*) foi clonada em fusão com o *lacZ* pela equipe do laboratório da França, gerando o vetor pFUS2-*cyaA*. A recombinação homóloga ocorre através da sequência de *cyaA* presente no vetor e no genoma da bactéria, resultando na interrupção do gene pela fusão com *lacZ*.

A transformação foi realizada através de conjugação da linhagem BPDR-RE usando a bactéria *E. coli* SM10  $\lambda$  pir, previamente transformada com o vetor pFUS2-*cyaA*.

#### 3.9.1 *Conjugação da B. pertussis BPDR-RE*

Inicialmente foram semeadas a BPDR-RE (resistente a Str e ácido nalidixico (Nal)) e a *E. coli* SM10  $\lambda$  pir -, pFUS2-*cyaA*, em placa de BG-ágar sangue suplementada com 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. As placas foram incubadas por 6 h a 37 °C. Após completado o tempo de incubação, uma porção da massa bacteriana foi semeada por esgotamento em placas contendo Gm (na concentração final de 10 µg/mL) e Nal (na concentração final de 30 µg/mL). A presença do Nal permite a eliminação da *E. coli* que é sensível a este antibiótico. Após 6 dias de incubação a 37 °C, algumas colônias isoladas foram semeadas em placas de BG-ágar sangue contendo Gm ou Str (10 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente) para confirmação da resistência a Gm e sensibilidade a Str.

### 3.9.2 *Extração do DNA a partir dos clones selecionados após a conjugação*

As colônias isoladas foram cultivadas em 5 mL de meio líquido SS com Gm (10 µg/mL) por 24 horas a 37 °C. Um mL do cultivo foi utilizado para extração de DNA genômico com o kit QIAamp® DNA mini (Qiagen, Courtaboeuf Cedex, France), seguindo as instruções do fabricante. O DNA genômico foi obtido em um volume final de 200 µL e, a partir deste material, foi realizada a confirmação da inserção do vetor pFUS2-*cyaA* no genoma da bactéria por PCR.

### 3.10 Confirmação da interrupção do gene *cyaA* nas colônias isoladas por PCR

Para confirmação da inserção do plasmídeo no genoma da bactéria foram usados os oligonucleotídeos chamados *cyaAUPUP* (GGTGCGAATCCGTTCAATCG), complementar à região *upstream* do gene *cyaA* e *LacZinv* (TCCCAGTCGGCAAACAGAACT) complementar à região *downstream* do gene repórter, *lacZ*. Como molde da reação foram usados 3 µL do DNA genômico extraído de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.2.

Para a reação foi utilizado o kit HotStarTaq Polimerase (Qiagen) e as instruções foram as sugeridas pelo fabricante. As amplificações foram realizadas em trinta ciclos com as seguintes temperaturas e tempos nas diferentes etapas:

95 °C, 10 min	
95 °C, 1 min	}
58 °C, 1 min	
72 °C, 1 min	
	30 ciclos
72 °C, 10 min.	

Uma vez completada a reação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo para visualização do material amplificado em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Imaging System Kodak.).

### 3.11 Purificação da toxina pertussis inativada PT-RE

Para a expressão e purificação da PT geneticamente inativada (PT-RE), foi necessário escalonar o volume do cultivo da bactéria BPDR-RE-CyaA<sup>-</sup> para estimular a produção e secreção da PT-RE. Inicialmente a bactéria foi cultivada por 48 h em BG sangue a 37 °C. Posteriormente, a massa bacteriana foi coletada da placa com ajuda de uma alça e ressuspensa em 15 mL de meio SS. Todas as condições, 37 °C, agitação constante de 100 rpm e 24 horas de crescimento após o inóculo, foram mantidas para todos os volumes trabalhados. Uma vez completado o tempo de cultivo em volume de 15 mL, este foi aumentado para 125 mL e finalmente para 800 mL. Após 24 h, as bactérias foram coletadas por centrifugação (8000 g por 20 min). O pH do sobrenadante, foi ajustado para 6 e, em seguida, submetido a remoção das bolhas de oxigênio com bomba a vácuo. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade. Para tanto, o sobrenadante foi adsorvido a resina Affi-gel® Blue (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos), em coluna de 5 mL, previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio, com um fluxo constante de 1 mL/min. A coluna foi lavada com 50 mL de tampão de lavagem e a proteína recuperada com o tampão de eluição da PT-RE. A purificação da PT-RE foi analisada por SDS-PAGE (15 % de acrilamida)

### 3.12 Análise da ligação de anticorpos à superfície de *S. pneumoniae*

A capacidade da ligação dos anticorpos, presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados por via i.n., à superfície do pneumococo foi analisada *in vitro*. A bactéria da linhagem ATCC6303 foi cultivada em meio THY a 37 °C até a DO<sub>600nm</sub>=0,5, centrifugada a 3200 g por 10 min e lavada com o mesmo volume de PBS. A bactéria foi suspensa no mesmo volume de PBS e 95 µL desta suspensão foram incubados com 5 µL dos soros dos camundongos imunizados (reunidos em pools de cada grupo), por 30 min a 37 °C. Em seguida, a bactéria foi lavada com PBS e suspensa em 100 µL de PBS contendo anti-IgG de camundongos conjugados a FITC (MP Biochemicals, Santa Ana, California, Estados Unidos), na diluição de 1:100 (v/v). As amostras foram incubadas no gelo e ao abrigo da luz por 30 min, lavadas com PBS e, posteriormente, a bactéria fixada com 200 µl da solução BD Cytotfix TM (BD

Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Estados Unidos). As análises de citometria de fluxo foram feitas em aparelho FACS Canto II (BD Biosciences), com a contagem de 10000 bactérias. Os dados foram analisados utilizando o programa Flow Jo 7.6.1 (Tree Star).

### 3.13 Análise da deposição do componente C3 do complemento à superfície de *S. pneumoniae*

Para a análise da ligação do componente C3 do sistema complemento à superfície de *S. pneumoniae*, bactérias da linhagem ATCC6303 foram cultivadas, lavadas e suspensas em PBS conforme descrito para o ensaio de ligação. Os soros foram aquecidos a 56 °C por 30 min, para a inativação das proteínas do sistema complemento. As bactérias foram incubadas com 5 µL dos soros (reunidos em *pools* de cada grupo) a 37 °C por 30 min e lavadas com PBS conforme descrito anteriormente. As bactérias foram suspensas em 90 µL tampão gelatina veronal (Sigma-Aldrich) contendo 10 µL de soro normal de camundongo (utilizado como fonte de complemento) e incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida, foi realizada uma lavagem com PBS e as bactérias incubadas por 30 min, com uma diluição de 1:100 de anti-C3 FITC (MP Biochemicals) em PBS, em gelo e ao abrigo da luz. As bactérias foram lavadas e fixadas conforme descrito para o ensaio de ligação de anticorpos na superfície do pneumococo. A leitura e as análises foram feitas conforme descrito no item 3.12.

### 3.14 Imunização passiva

#### 3.14.1 *Purificação de IgG*

Para a realização dos ensaios relacionados à avaliação do papel protetor da IgG anti-PspA5 estimulados pela formulação PspA5-wP foram utilizados soros provenientes de experimentos de imunização anteriores (Oliveira, Miyaji et al., 2010). Como controle negativo foi utilizada IgG purificada de soro hiper-imune de camundongos imunizados

com o antígeno Intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica, disponível no laboratório (Ferreira, Campos, 2008).

A purificação de IgG foi feita por afinidade a proteína G, usando colunas HiTrap™ (GE – Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom). A velocidade do fluxo dos tampões ou da amostra foram sempre constantes, 1 mL/min, e os soros diluídos com o tampão de ligação na proporção de 1:5. Inicialmente a coluna foi equilibrada com 20 volumes do tampão de ligação de anticorpos e, uma vez equilibrada, os soros diluídos foram passados pela coluna para a adsorção dos anticorpos na resina pela afinidade à proteína G. Posteriormente a coluna foi equilibrada com 10 volumes do tampão de ligação de anticorpos para, finalmente, recuperá-los usando o tampão de eluição de anticorpos. O pH da solução foi ajustado rapidamente para 7,2 - 7,4 com tampão de neutralização, evitando a degradação das moléculas de IgG sensíveis a ácido. A determinação da concentração das IgGs purificadas foi realizada por comparação das bandas em SDS-PAGE (12 % de acrilamida) com base em uma curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) aplicada no mesmo gel. Os anticorpos foram estocados a -20 °C até o seu uso.

#### *3.14.2 Purificação da fração F(ab')<sub>2</sub> a partir da IgG purificada*

A partir das IgG purificadas, anti-PspA5, ou anti-intimina, as frações F(ab')<sub>2</sub> foram preparadas pelo uso do “kit Pierce™ F(ab')<sub>2</sub> preparation” (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos), seguindo instruções do fabricante. A determinação da concentração da fração foi realizada por comparação das bandas em SDS-PAGE (8 % de acrilamida) com base em uma curva padrão de BSA aplicada no mesmo gel. As frações foram estocadas a -20 °C até o seu uso.

#### *3.14.3 Protocolo de imunização passiva*

De acordo com cada experimento, camundongos BALB/c foram inoculados por via i.p. com 500 µL de uma solução contendo 50 ou 20 µg de IgG purificada, soros totais contendo 50 ou 20 µg de IgG ou a massa equivalente à massa molar de 20 µg de

IgG, das frações F(ab')<sub>2</sub>. Duas horas após a inoculação, os camundongos foram desafiados por via respiratória com *Streptococcus pneumoniae* ATCC6303, conforme descrito no item 3.8.1. No ensaio de imunização passiva realizado para avaliação da proteção mediada pela fração F(ab')<sub>2</sub> foram usados como controles positivos o soro de animais imunizados com PspA5-wP e a imunoglobulina G (IgG) purificada deste soro. Como controles negativos, utilizou-se IgG e F(ab')<sub>2</sub> purificadas de soro hiper-imune não relacionado (anti-intimina).

#### 3.14.4 Depleção de proteínas do sistema complemento

Camundongos BALB/c foram imunizados com seis doses da formulação PspA5-wP, de acordo com o protocolo de imunização descrito no item 3.7. Vinte dias após a última dose, os animais foram inoculados pela via i.p. com 50 µg de Cobra Venom Factor (CVF, Quidel, San Diego, CA, Estados Unidos), o correspondente a 19 U, por animal. Os camundongos foram desafiados com a bactéria ATCC6303, conforme descrito no item 3.8.1, 24 h após a primeira inoculação de CVF, e mantidos em observação por 10 dias para análise da sobrevivência. Durante a observação do desafio, os animais receberam mais uma dose de CVF, 48 h após a primeira (24 h após o desafio). Um grupo controle vacinado com PspA5-wP, recebeu as doses de CVF mas não o desafio, para o controle de possíveis efeitos deletérios deste fator.

#### 3.15 Análises estatísticas

A comparação dos níveis de anticorpos entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. A sobrevivência foi analisada por curvas de sobrevivência de Kaplan-Meyer ou pelo teste exato de Fisher. Em todos os casos,  $P \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos e análises foram realizados pelo programa Prism Graph-Pad 5.03

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterização das propriedades adjuvantes de *B. pertussis* em combinação a PspA5 em camundongos BALB/c

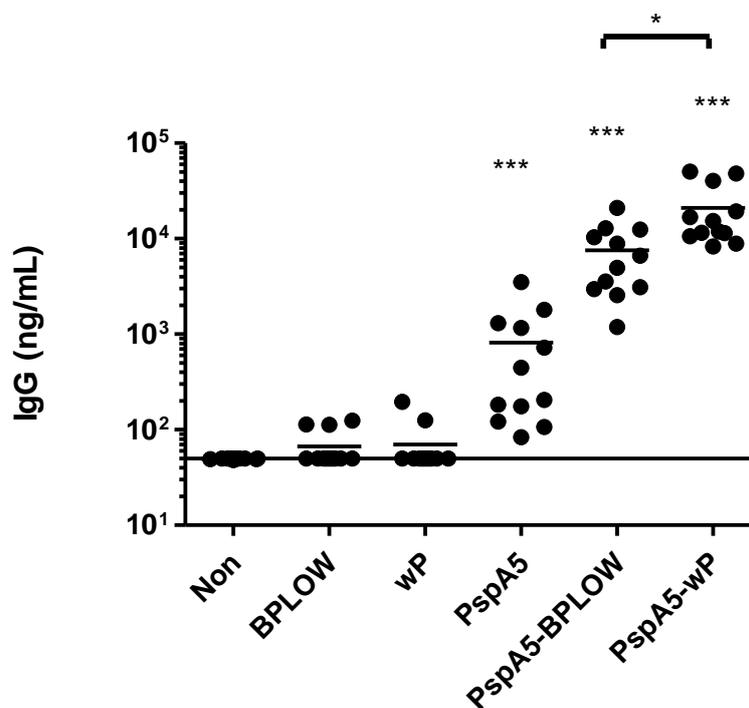
Na etapa inicial deste trabalho foram propostos ensaios para a avaliação e caracterização das propriedades adjuvantes de *B. pertussis* através do uso de linhagens mutantes, defectivas para a expressão de fatores de virulência, em combinação ao antígeno PspA5. O grupo coordenado pela Dra. Nathalie Mielcarek e pelo Dr. Camille Locht do Instituto Pasteur, Lille, França, que estuda as propriedades de vacinas de mucosas compostas de *B. pertussis* vivas atenuadas, contra coqueluche, construiu linhagens de *B. pertussis*, que apresentam deficiência ou baixa expressão de fatores de virulência. Estas linhagens foram cedidas gentilmente para o desenvolvimento deste trabalho. A linhagem BPSM de *B. pertussis*, naturalmente resistente a estreptomicina e derivada da linhagem Tohama I, foi a linhagem parental (Menozzi, Mutombo, 1994) para a construção dos mutantes.

#### 4.1.1 Comparação do efeito adjuvante dos mutantes de *B. pertussis* em relação à vacina wP

Camundongos BALB/c foram imunizados por via nasal com uma dose de 5 µg da proteína PspA5 combinada à vacina wP ou à bactéria BPLOW inativada. O mutante BPLOW foi o escolhido primeiramente para a comparação com as propriedades adjuvantes da vacina wP, por apresentar mutações que afetam a atividade do regulon BvgAS (Melvin, Scheller et al., 2014) e, conseqüentemente a expressão de diferentes fatores de virulência.

Na figura 2 pode-se observar a indução de IgG anti-PspA5 em camundongos imunizados com as formulações compostas pela proteína PspA5 como antígeno e a vacina wP ou a mutante BPLOW como adjuvantes (PspA5-wP ou PspA5-BPLOW). A indução de IgG anti-PspA5 foi estatisticamente mais alta em todos os grupos que receberam PspA5 em relação aos níveis de anticorpos observados nos grupos controle ( $P < 0.001$ ). Entretanto, os animais imunizados com PspA5-wP ou PspA5-BPLOW

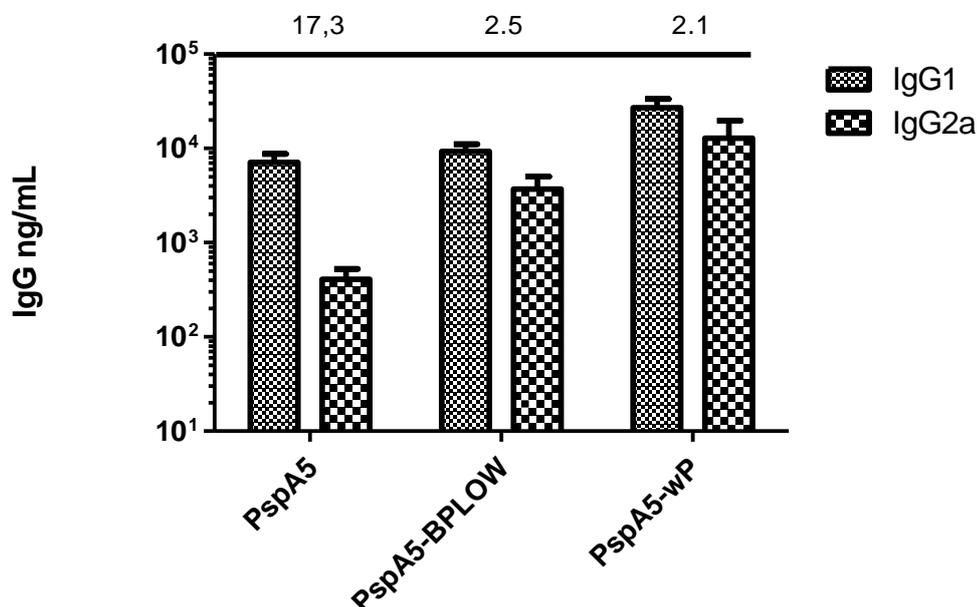
apresentaram níveis significativamente mais altos de anticorpos em relação aos níveis observados no grupo que recebeu a proteína PspA5 sozinha,  $P < 0,001$  para ambas as comparações. Além disso, a indução de IgG anti-PspA5 foi estatisticamente superior nos animais que receberam PspA5-wP em comparação com as concentrações observadas nos animais imunizados com PspA5-BPLOW ( $P=0,01$ ).



**Figura 2. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, os camundongos BALB/c foram submetidos à sangria e os soros foram coletados para quantificação dos anticorpos IgG anti-PspA5 por ELISA. O gráfico foi composto com os resultados de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo cada. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \* $P = 0,01$ , teste de Mann Whitney. A linha indica o limite de detecção da técnica. BPLOW: baixa expressão de diferentes fatores de virulência, wP: vacina celular pertussis.

Os soros dos animais foram avaliados quanto a presença dos subtipos IgG1 e IgG2a anti-PspA5. Os resultados apresentados na Figura 3 mostram que ambas as formulações PspA5-wP e PspA5-BPLOW, apresentaram uma resposta com tendência ao tipo Th2, com produção preferencial de IgG1, mas também com claro aumento na produção de IgG2a. Nos animais imunizados com PspA5, a resposta foi também

direcionada para o tipo Th2. Entretanto, observou-se níveis mais baixos de IgG2a e maior razão IgG1:IgG2a.



**Figura 3. Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PsA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG1 e IgG2a anti-PspA5 por ELISA. O gráfico foi composto com os resultados de 2 experimentos independentes com 6 animais por grupo cada. As barras representam as médias das concentrações com os desvios padrão. Os números acima das barras são os valores das razões IgG1/IgG2a, calculados para cada grupo. BPLOW: baixa expressão de diferentes fatores de virulência, wP: vacina celular pertussis.

A sobrevivência dos camundongos BALB/c imunizados com PspA5-BPLOW ou PspA5-wP foi avaliada após o desafio respiratório invasivo com a linhagem de pneumococo ATCC6303. Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que 83,3% dos animais imunizados com a formulação PspA5-wP sobreviveram ao desafio, e este resultado foi estatisticamente significativo quando comparado ao resultado observado nos animais não imunizados ( $P < 0,01$ ), imunizados com wP ( $P < 0,01$ ) ou com PspA5 ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, apenas 50% dos animais imunizados com PspA5-BPLOW sobreviveram ao desafio. Este resultado está no limite de significância quando comparado à proteção observada no grupo não imunizado ( $P = 0,05$ ). Além disso, a imunização com PspA5-BPLOW não foi significativamente superior à proteção

observada nos animais imunizados com BPLOW ou PspA5. A proteína PspA5 sozinha conferiu proteção a 33,3% dos animais.

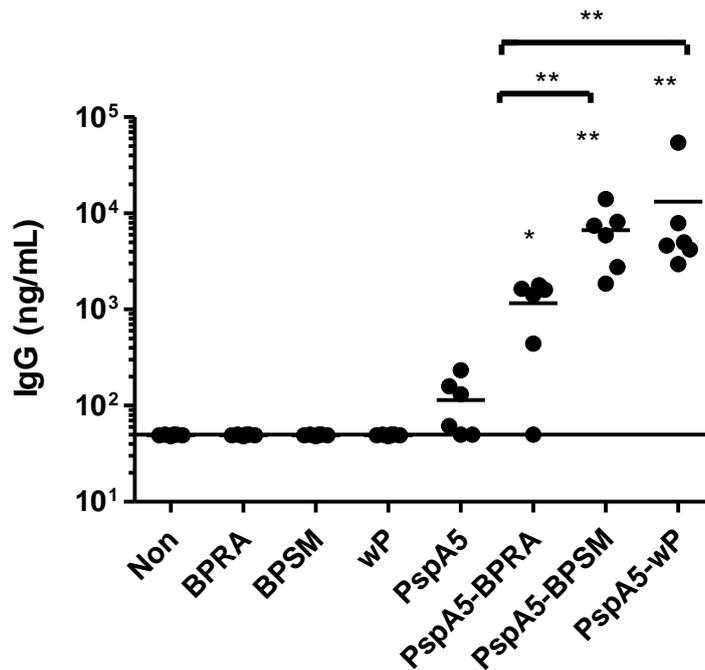
**Tabela 2.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante da linhagem atenuada BPLOW

Grupos	Vivos/total	% sobrevivência	P*
Non	0/6	---	----
BPLOW	1/12	8,3	1
wP	2/12	16,6	0,53
PspA5	4/12	33,3	0,24
PspA5-BPLOW	6/12	50,0	0,05
PspA5-wP	10/12	83,3	0,002

\*teste exato de Fisher. Comparações com o grupo não imunizado (Non). Resultados correspondentes a dois experimentos independentes.

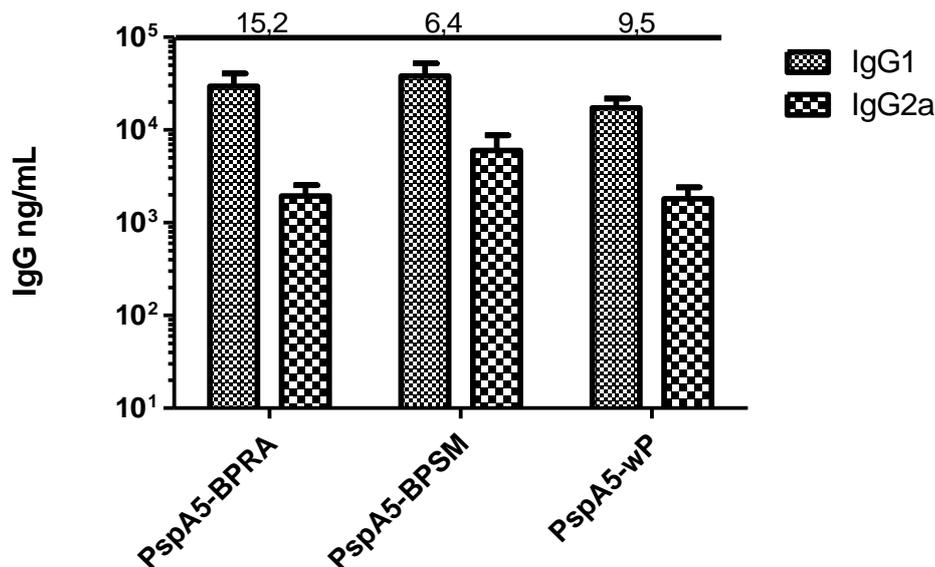
Um dos importantes fatores de virulência que tem expressão diminuída na linhagem BPLOW é a PT. Assim, com base nos resultados obtidos, decidiu-se avaliar a propriedade adjuvante da linhagem BPRA, que apresenta deleção do gene *ptx* que codifica PT (Antoine and Loch, 1990) em combinação a PspA5. As formulações PspA5-BPSM e PspA5-wP foram usadas como controles positivos.

Na figura 4 pode-se observar que as três formulações PspA5-BPRA, PspA5-BPSM e PspA5-wP estimularam níveis significativamente mais altos de IgG anti-PspA5 para o grupo PspA5-BPRA, PspA5-BPSM e PspA5-wP com relação aos níveis observados no grupo imunizado com PspA5,  $P < 0,05$  ou  $P < 0,01$ . Observa-se, também, que as formulações que contém as bactérias selvagens, PspA5-BPSM e PspA5-wP, estimularam a produção de IgG anti-PspA5 em níveis estatisticamente superiores em relação à observada com a formulação PspA5-BPRA,  $P = 0,002$  para ambas as formulações.



**Figura 4. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, os camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes compostos por 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  teste de Mann Whitney. A linha representa o limite de detecção da técnica. BPRa: Defectiva para expressão de PT, BPSM: linhagem parental derivada de Tohama I, wP: vacina celular pertussis.

Os subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, foram avaliados nos animais imunizados com PspA5-BPRa, PspA5-BPSM ou PspA5-wP (Figura 5). As três formulações induziram preferencialmente a produção de IgG1, porém com alta produção de IgG2a também.



**Figura 5. Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG1 e IgG2a anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes, compostos por 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os desvios padrão. Os números acima das barras são os valores das razões IgG1/IgG2a calculados para cada grupo. BPRa: Defectiva para expressão de PT, BPSM: linhagem parental derivada de Tohama I, wP: vacina celular pertussis.

Os animais foram submetidos ao desafio respiratório invasivo com a linhagem de pneumococo ATCC6303 (Tabela 3). A imunização com PspA5-BPSM ou PspA5-wP induziu a proteção de 83,3 % e 66,7 % dos animais, respectivamente ( $P=0,02$  e  $P=0,06$ , em relação aos dados observados nos animais não imunizados). Por outro lado, a imunização com PspA5-BPRa, protegeu apenas 16,7%. Esta porcentagem de proteção foi igual à observada nos animais imunizados com a proteína PspA5 sozinha.

**Tabela 3.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante da mutante de *B. pertussis* defectiva para a expressão da PT.

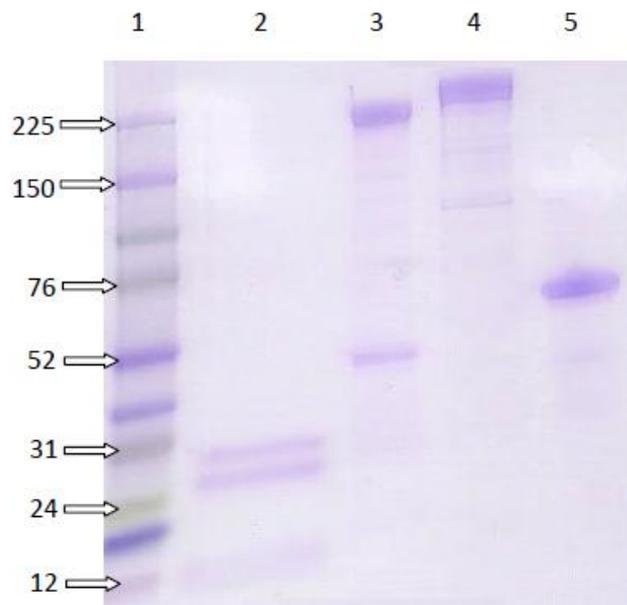
Grupos	Vivos/total	% sobrevivência	P*
Non	0/6	---	---
BPRA	0/6	---	1
BPSM	1/6	16,7	1
wP	0/6	---	1
PspA5	1/6	16,7	1
PspA5-BPRA	1/6	16,7	1
PspA5-BPSM	5/6	83,3	0,02
PspA5-wP	4/6	66,7	0,06

\*teste exato de Fisher. Comparações com o grupo não imunizado (Non).

#### 4.1.2 Efeito adjuvante de diferentes componentes de *B. pertussis* quando inoculados em combinação com PspA5 em camundongos BALB/c

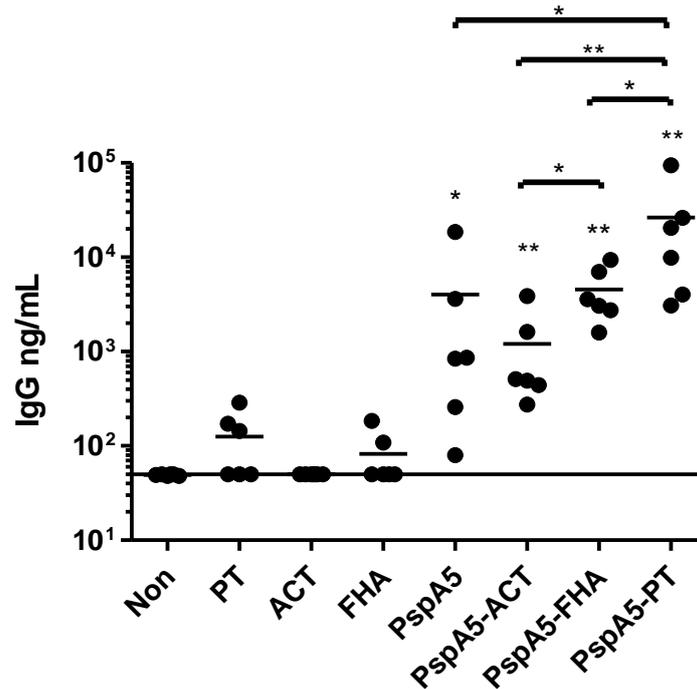
Para melhor caracterizar os componentes importantes na atividade adjuvante de *B. pertussis* foram avaliados, neste modelo, alguns fatores de virulência purificados. Estes fatores foram obtidos comercialmente.

A figura 6 mostra um SDS-PAGE com gradiente de 4 a 20 % de acrilamida das proteínas PT, ACT, FHA e do fragmento N-terminal de PspA5 nas canaletas 2, 3, 4 e 5 respectivamente. A proteína PT apresentou várias bandas que se encontram entre 12 e 31 kDa. Estas bandas estão na faixa da massa descrita na literatura (entre 11 e 26 kDa) para as diferentes subunidades de PT, S1 a S5 (Pourahmadi, 2004). As bandas das proteínas ACT e FHA apresentam massas estimadas de 220 kDa (Leusch, Paulaitis, 1990; Lambert-Buisine, Willery, 1998) e foram observadas próximas da banda do marcador molecular que corresponde a 225 kDa. O fragmento de PspA5 tem massa estimada de 45,9 kDa e, na figura 6 (canaleta 5), a proteína foi observada entre as bandas que correspondem a 52 e 76 kDa do marcador de massa molecular. Essa migração anômala da proteína PspA em SDS-PAGE foi descrita anteriormente (Yother and Briles, 1992) e é também observada para diferentes variantes da proteína.



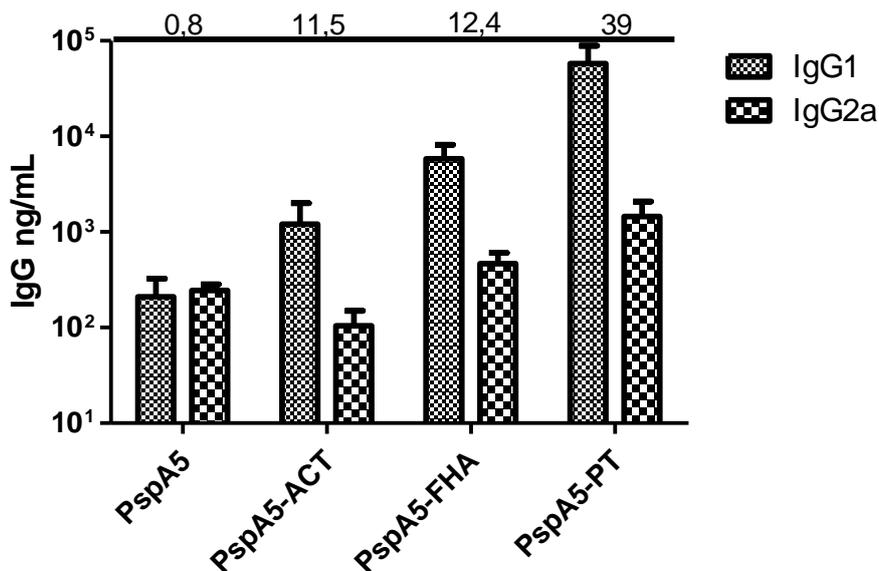
**Figura 6. Perfil eletroforético das diferentes proteínas utilizadas** 1) padrão de massa molecular (Broad-Range Rainbow – GE Healthcare), 2) PT, 3) ACT, 4) FHA e 5) PspA5.

Camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína PspA5 sozinha ou com as diferentes combinações. Todos os grupos que receberam PspA5 apresentaram níveis de IgG anti-PspA5 significativamente mais altos que os animais não imunizados,  $P < 0,05$  para o grupo que recebeu PspA5 e  $P < 0,01$  para os demais (Figura 7). A avaliação comparativa da indução de IgG anti-PspA5 mostrou que a formulação PspA5-PT induziu os níveis mais altos destes anticorpos, sendo diferentes estatisticamente de todos os outros grupos, incluindo os grupos imunizados com PspA5 ( $P < 0,05$ ), PspA5-ACT ( $P < 0,01$ ) ou PspA5-FHA ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, a imunização com as formulações PspA5-ACT ou PspA5-FHA induziu concentrações de IgG anti-PspA5 em níveis semelhantes à proteína PspA5 sozinha, apesar de haver maior homogeneidade de resposta entre os animais destes grupos em relação aos animais imunizados com PspA5, principalmente no grupo imunizado com PspA5-FHA. O grupo imunizado com PspA5-FHA apresentou, ainda, níveis de IgG anti-PspA5 significativamente mais altos que o grupo imunizado com PspA5-ACT ( $P < 0,05$ ).



**Figura 7. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto a presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes, compostos por 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$ , teste de Mann Whitney. A linha representa o limite mínimo de detecção da técnica.

A avaliação dos subtipos de IgG, apresentada na figura 8, mostrou novamente que as imunizações com as formulações combinadas induziram preferencialmente a produção de IgG1, caracterizando, portanto respostas do tipo Th2. Entre os grupos, os níveis mais altos tanto de IgG1 como de IgG2a foram observados nos animais imunizados com PspA5-PT ou PspA5-FHA.



**Figura 8. Indução dos subtipos IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PsA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG1 e IgG2a anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados são de um experimento representativo de dois experimentos independentes, compostos por 6 animais por grupo. As barras representam as médias dos grupos com os desvios padrão. Os números acima das barras são os valores das razões IgG1/IgG2a calculados para cada grupo.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos na avaliação da sobrevivência dos animais imunizados com PspA5-PT, PspA5-ACT, PspA5-FHA e seus respectivos controles, após o desafio respiratório invasivo com a linhagem de pneumococo ATCC6303. Os resultados mostram que a formulação PspA5-PT conferiu sobrevivência a 100 % dos animais, sendo este grupo estatisticamente diferente dos respectivos grupos controles (PspA5 e PT) e também do grupo não imunizado (Non), nos três casos com um  $P=0,002$ . A imunização com PspA5-FHA conferiu proteção parcial, com 50 % de sobrevivência dos animais. Por outro lado, a imunização com PspA5-ACT protegeu apenas 16,6 % dos animais.

**Tabela 4.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante dos componentes de *B. pertussis* purificados.

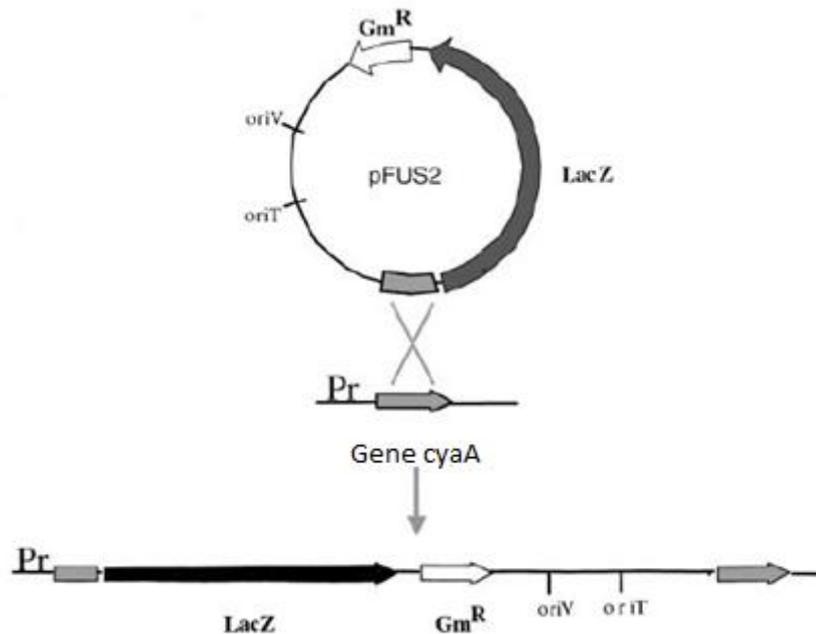
Grupos	Vivos/total	% sobrevivência	P*
Non	0/6	----	---
ACT	0/6	----	1
FHA	0/6	----	1
PT	0/6	----	1
PspA5	0/6	----	1
PspA5-ACT	1/6	16,6	1
PspA5-FHA	3/6	50	0,18
PspA5-PT	6/6	100	0,002

\*teste exato de Fisher. Comparações com o grupo não imunizado (Non).

Com base nos resultados apresentados, foi proposta a avaliação do papel da atividade enzimática de PT na ação adjuvante observada.

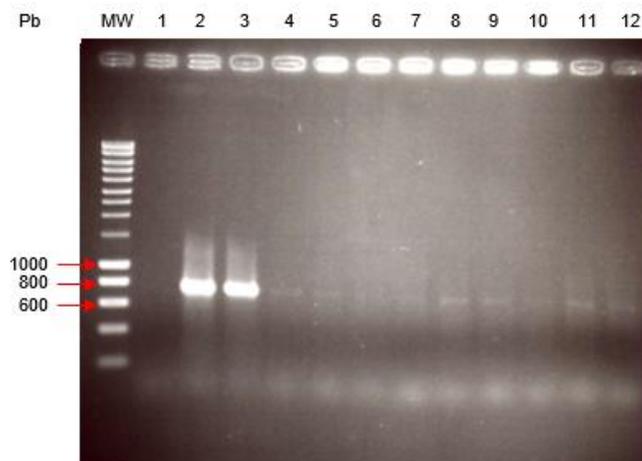
Para alcançar este objetivo, foi proposta a purificação da PT a partir da linhagem *B. pertussis* BPDR-RE. A PT expressa pela linhagem BPDR-RE (PT-RE) foi inativada geneticamente por substituições dos resíduos de arginina e ácido glutâmico, por resíduos de leucina (R13L) e de glicina (E129G) respectivamente, presentes na subunidade S1. Estas substituições abolem a atividade enzimática da PT, sem interferir na estrutura da toxina (Alonso, Pethe, 2001). A purificação da PT-RE foi realizada durante estágio no laboratório do Dr. Camille Locht no Instituto Pasteur de Lille, França.

Inicialmente, foi realizada a interrupção do gene que codifica a ACT, *cyaA*, produzindo a linhagem BPDR-RE-CyaA<sup>-</sup>. O objetivo desta estratégia foi evitar uma possível contaminação da PT-RE purificada com atividade de ACT, o que poderia prejudicar a avaliação da atividade de PT-RE como adjuvante em nosso modelo. A construção do mutante foi feita através da transformação da bactéria com o vetor suicida pFUS2-*cyaA*. Este vetor carrega a porção N-terminal do gene *cyaA* em fusão com o gene *lacZ*. A marca de resistência a antibiótico permite a seleção de clones que sofreram recombinação homóloga em *cyaA*, gerando a interrupção deste gene pela fusão com *lacZ* no genoma da bactéria (Figura 9). A transformação foi realizada pela conjugação da *E. coli* SM10  $\lambda$  pir – pFUS2-*cya* com a BPDR-RE.



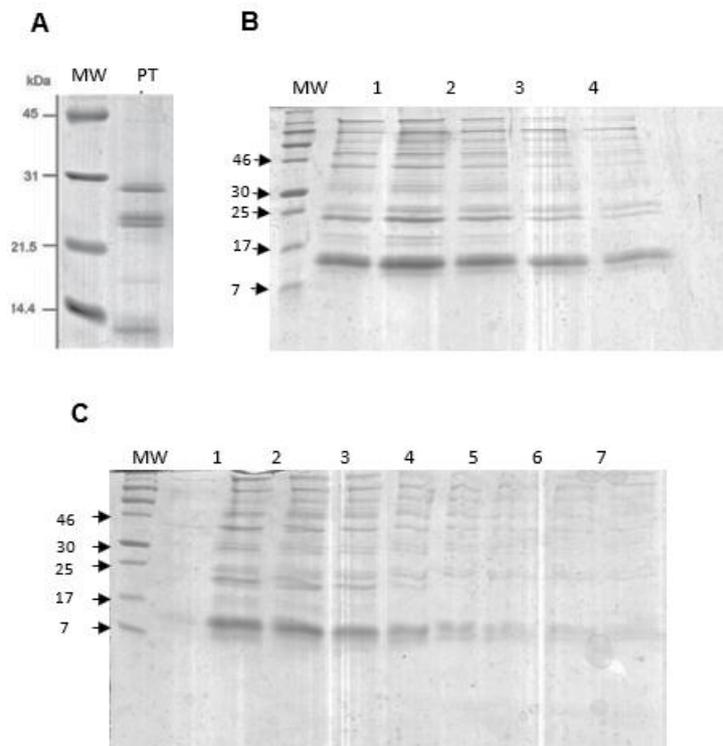
**Figura 9. Esquema de interrupção do gene *cyaA* usando o vetor *pFUS2-cya*** – adaptado de Loch *et al.*, 2004. O vetor *pFUS2-cyaA* contém a origem ColE1 de replicação (*oriV*), uma origem de transferência (*oriT*), um gene de resistência a gentamicina (*Gm<sup>R</sup>*), e o gene de interesse, *cyaA* em fusão com o gene *lacZ*. Abaixo, a estrutura do locus alvo após a integração do *pFUS2-cyaA*. Pr, região do promotor.

Após seleção de clones resistentes ao antibiótico Gm, a interrupção do gene *cyaA* foi avaliada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos que anelam no gene *cyaA* e no gene *lacZ* carregado pelo vetor. Na figura 10 pode-se observar que após o PCR, usando iniciadores que amplificam o segmento compreendido entre o gene *cyaA* e o gene repórter *lacZ*, dois clones apresentaram uma banda com tamanho de 721 pb, conforme esperado. A inativação da atividade hemolítica da ACT foi também comprovada pela ausência de halo de hemólise após plaqueamento dos clones em BG-ágar sangue. Após o cultivo dos diferentes clones, foi conferido que os clones 2 e 3 não apresentaram hemólise (dados não mostrados).



**Figura 10. Avaliação dos clones de *B. pertussis* após transformação com o vetor pFUS2-cyaA.** Amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para a região upstream do gene *cyaA* e downstream do gene *lacZ* em 12 clones obtidos após a transformação da *B. pertussis* por conjugação. MW: Marcador de massa molecular – Smart ladder (Eurogentec)

O clone 2 foi escolhido para a purificação de PT-RE, seguindo a metodologia descrita no item 3.11. As amostras foram avaliadas por SDS-PAGE em gel de 15% de acrilamida para confirmação da presença e pureza da proteína (PT-RE). A figura 11.A apresenta uma purificação padrão de PT nativa, realizada a partir da linhagem selvagem BPSM, pela equipe do laboratório da França, para comparação com o resultado da purificação da PT-RE. O perfil de purificação da PT nativa, foi de 5 bandas correspondentes às diferentes subunidades que compõem a PT com as seguintes massas moleculares: S1= 26 kDa, S2= 21.8 kDa, S3= 21.7 kDa, S4= 12 kDa e S5= 11.7 kDa. Foram realizadas duas tentativas de purificação da PT-RE, que são apresentadas nas figuras 11.B e C. Pode se observar nas duas purificações que as amostras apresentaram bandas de diferentes tamanhos, não sendo possível a detecção da PT-RE purificada. Uma das hipóteses levantadas foi a contaminação por proteínas intracelulares decorrentes de lise das bactérias durante o cultivo.

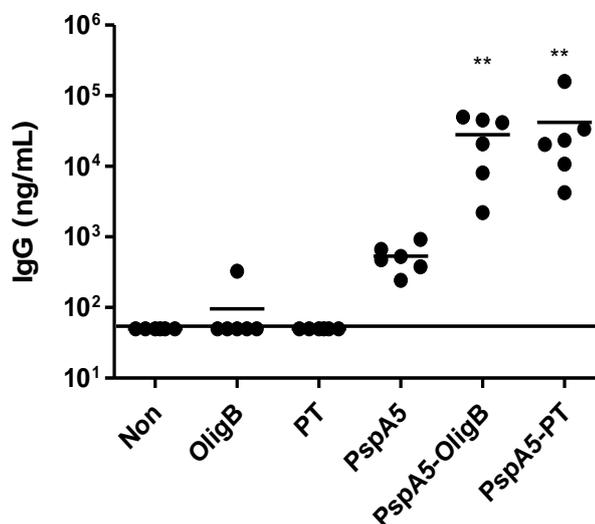


**Figura 11. Perfil eletroforético das amostras eluídas da coluna para avaliação da purificação da PT-RE.** Os sobrenadantes de cultivo da *B. pertussis* BPDR-RE CyaA<sup>-</sup> foram submetidos a cromatografia de afinidade usando a resina resina Affi gel Blue<sup>™</sup> (B e C). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (15%). Após a corrida o gel foi corado com comassie blue. Em (A) é apresentado o padrão de bandas da PT nativa. MW) Padrões de massa molecular Low Range (Bio-Rad) (A) e Broad Range (Bio-Rad) (B e C).

Como alternativa ao uso da PT-RE foi proposto o uso do oligômero B (OligB) da PT (subunidade responsável pela ligação da toxina aos receptores celulares, disponível comercialmente) para avaliação da sua propriedade adjuvante quando combinada a PspA5. Assim, a atividade adjuvante na ausência da subunidade enzimática S1 tornou-se possível.

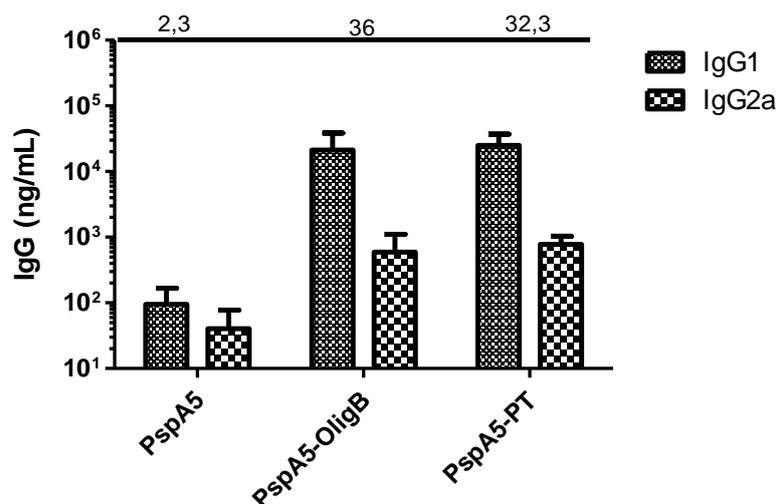
Os animais foram imunizados pela via i.n. com uma dose de PspA5 sozinho ou combinado a PT ou OligB. Os grupos controles do ensaio receberam somente OligB, PT ou não foram imunizados (Non). A figura 12 mostra as concentrações de IgG anti-PspA5 após a imunização. Pode se observar que os níveis de IgG anti-PspA5 nos animais imunizados com PspA5-OligB ou PspA5-PT foram estatisticamente superiores aos níveis observados nos animais imunizados com PspA5 (ambas com  $P < 0,01$ ). Por

outro lado, não houve diferença significativa entre os níveis de IgG anti-PspA5 detectados nos grupos imunizados com PspA5-OligB e PspA5-PT.



**Figura 12. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, os camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto a presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados representam um experimento, composto por 6 animais cada grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos.  $**P < 0.01$ , teste de Mann Whitney. A linha representa o limite mínimo de detecção da técnica.

Os níveis dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 estão apresentados na figura 13. Observa-se que, em comparação aos animais imunizados com PspA5, os animais que receberam PspA5-OligB ou PspA5-PT, apresentaram concentrações mais altas dos subtipos de IgG, especialmente IgG1. Os grupos imunizados com PspA5-OligB e PspA5-PT tiveram uma razão IgG1/IgG2a, direcionada para o tipo Th2, sem diferença entre os grupos. A imunização com PspA5 induziu uma resposta mais balanceada, porém com níveis baixos de anticorpos.



**Figura 13. Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a anti- PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto a presença de IgG1 e IgG2a anti-PspA5 por ELISA. Os dados representam um experimento, composto por 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os desvios padrão. Os números acima das barras são os valores das razões IgG1/IgG2a calculadas para cada grupo.

Vinte e um dias após a imunização com uma das diferentes formulações, os camundongos foram submetidos ao desafio respiratório invasivo com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. A sobrevivência dos animais, registrada durante os 10 dias posteriores ao desafio letal, é apresentada na tabela 5. Os grupos imunizados com PspA5-OligB ou PspA5-PT apresentaram 83,3 % e 80 % de sobrevivência, respectivamente, e estas porcentagens foram significativamente superiores quando comparadas ao grupo não imunizado ( $P=0,02$  para ambos os grupos). O grupo imunizado com PspA5 apresentou apenas 16,7 % de sobrevivência.

**Tabela 5.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação da atividade adjuvante de PT e OligB.

Grupos	Vivo/total	% sobrevivência	P*
Non	0/6	---	---
OligB	1/6	16,7	1
PT	0/6	---	1
PspA5	1/6	16,7	1
PspA5-OligB	5/6	83,3	0,02
PspA5-PT	4/5	80,0	0,02

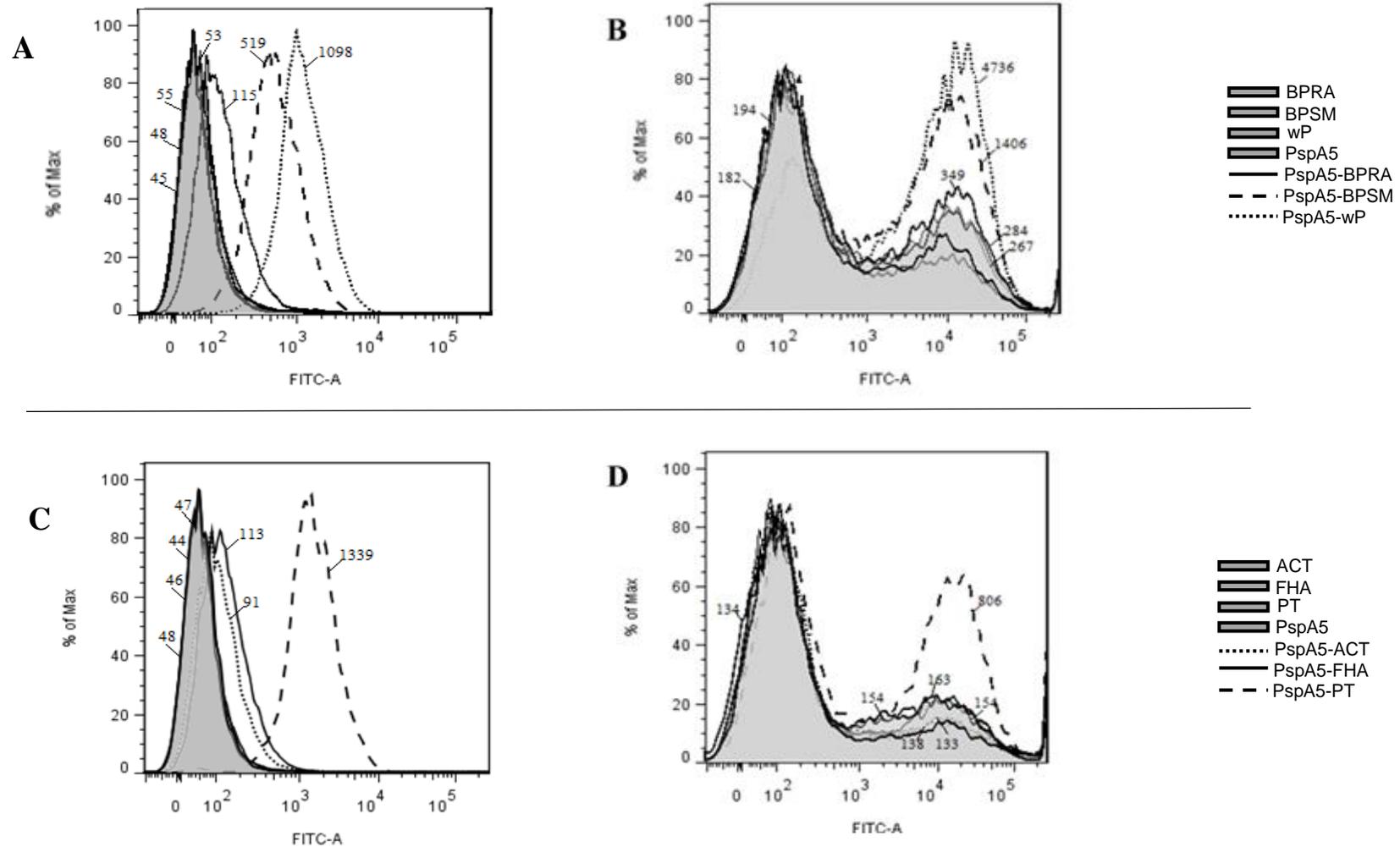
\*teste exato de Fisher. Comparações com o grupo não imunizado (Non).

#### 4.1.3 Avaliação da funcionalidade da IgG anti-PspA5 induzida pelas diferentes formulações

Os ensaios a seguir foram propostos para a avaliação da capacidade de ligação da IgG anti-PspA5, induzida pela imunização dos camundongos com as diferentes formulações, na superfície da bactéria ATCC6303. Além disso, foram avaliados os efeitos desta ligação na indução da deposição do componente C3 na superfície da bactéria. Estes ensaios foram realizados *in vitro* com os soros obtidos dos experimentos de imunização reunidos em *pools* de cada grupo. Após incubação com anticorpo secundário anti-IgG conjugado a FITC ou com anti-C3 conjugado a FITC, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo. As curvas de detecção da ligação de IgG anti-PspA5 à superfície da bactéria ATCC6303 estão representadas nos painéis A e C da figura 14. As curvas de detecção da deposição de C3 na superfície das bactérias são apresentadas nos painéis B e D da figura 14.

A análise dos soros dos grupos imunizados com as formulações contendo as bactérias inteiras como adjuvantes mostrou que o pool dos soros de animais imunizados com PspA5-wP e PspA5-BPSM apresentaram maior capacidade de ligação à superfície do pneumococo (medianas de 1098 e 519, Figura 14A) e de indução da deposição de complemento (medianas de 4736 e 1406, Figura 14B) Por outro lado, as medianas das curvas obtidas para o soro dos animais imunizados com PspA5-BPRA foram ligeiramente superiores às medianas das curvas obtidas para os soros dos animais imunizados com PspA5, com os adjuvantes, ou não imunizados (medianas de 115 e 349, Figuras 14A e B). Todos os outros soros apresentaram medianas iguais ao soro dos animais não imunizados, tanto para ligação como para deposição de complemento.

A análise dos soros dos grupos imunizados com as formulações contendo os componentes purificados como adjuvantes mostrou que o soro dos animais imunizados com PspA5-PT apresentou maior capacidade de ligação de IgG (mediana 1339, Figura 14C) e de deposição do componente C3 (mediana de 806, Figura 14D) em relação a todos os outros soros. Os soros dos animais imunizados com PspA5-ACT ou PspA5-FHA apresentaram ligação de IgG levemente superior aos soros dos grupos controle (medianas de 113 e 91, respectivamente, Figura 14C). Entretanto, não houve diferença destes soros quanto à capacidade de indução da deposição de C3 na superfície das bactérias em relação aos soros dos grupos controle. Novamente, Todos os outros soros apresentaram medianas iguais ao soro dos animais não imunizados, tanto para ligação como para deposição de complemento.



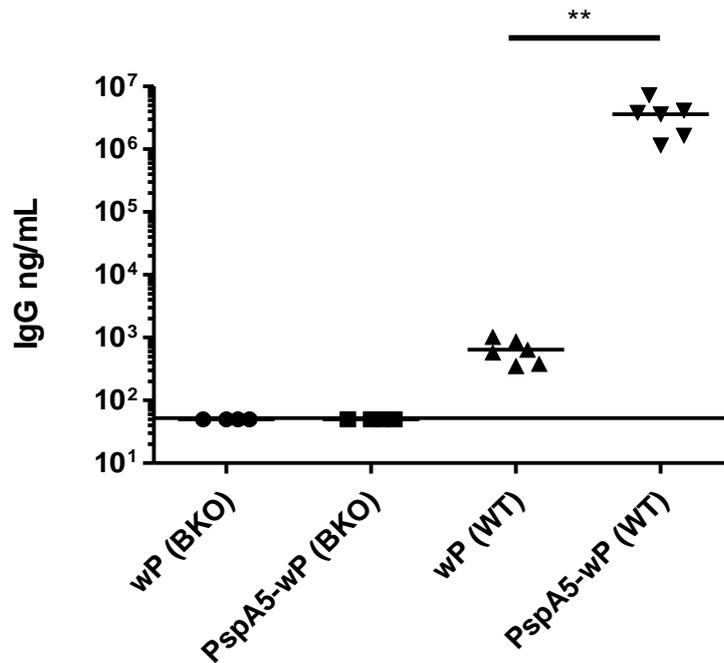
**Figura 14. Ligação de IgG anti-PspA5 e indução da deposição de complemento na superfície da linhagem de pneumococo ATCC6303.** A capacidade dos soros de camundongos BALB/c imunizados com as diferentes formulações de se ligar à superfície de *S. pneumoniae* (A e C) e de induzir deposição do componente C3 *in vitro* (B e D) foi avaliada por citometria de fluxo. As bactérias foram incubadas com 5% de soro e os resultados foram observados por citometria de fluxo, através do uso de anti-IgG de camundongo ou anti-C3 de camundongos conjugados a FITC. A mediana da intensidade de fluorescência é mostrada na figura para os diferentes grupos. Para facilitar a visualização, os grupos que apresentaram curvas semelhantes ao grupo controle não imunizado (Non) foram representados como áreas em cinza.

#### 4.2 Avaliação do papel dos anticorpos na proteção induzida pela vacina PspA5-wP

Os experimentos apresentados a seguir foram realizados com o objetivo de caracterizar melhor o papel dos anticorpos induzidos pela formulação PspA5-wP e do sistema complemento na proteção dos animais contra o desafio respiratório invasivo com a linhagem de pneumococo ATCC6303.

Para caracterizar a importância dos anticorpos na sobrevivência dos animais, camundongos C57BL/6 e BKO (linhagem  $\mu\text{MT}^{-/-}$  que apresenta deficiência na maturação de células B) foram imunizados com a formulação PspA5-wP pela via i.n. em esquema vacinal de seis doses, protocolo que induz altos níveis de anticorpos em animais selvagens (Oliveira, Miyaji et al., 2010). Após imunização, os soros foram coletados para avaliação de indução de IgG anti-PspA5, os animais foram desafiados com a linhagem de pneumococo - ATCC6303 e a sobrevivência registrada.

A figura 15 mostra que, como esperado, não foi possível detectar IgG anti-PspA5 nos soros dos animais BKO após vacinação com PspA5-wP. No grupo de animais selvagens que recebeu a formulação PspA5-wP, foram detectadas concentrações de IgG anti-PspA5 significativamente superiores às concentrações observadas no grupo vacinado com o adjuvante wP ( $P < 0,01$ ).



**Figura 15. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Camundongos C57BL/6 selvagem (WT) e *Knockout* para células B (BKO) foram imunizados por via i.n. com 6 doses das diferentes formulações. Vinte dias após a última dose, os animais foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados representam um experimento, com grupos compostos por 6 camundongos C57BL/6 e 4 BKO. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. \*\* $P < 0,01$ , teste de Mann Whitney. A linha indica o limite mínimo de detecção da técnica.

Na tabela 6 são mostrados os resultados da sobrevivência dos camundongos após o desafio com a bactéria ATCC6303. Os animais C57Bl/6 WT imunizados com PspA5-wP apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto que nenhum animal BKO submetido ao mesmo regime de imunização sobreviveu ao desafio. Além disso, nenhum dos camundongos selvagens ou BKO imunizados com a wP sobreviveu ao desafio.

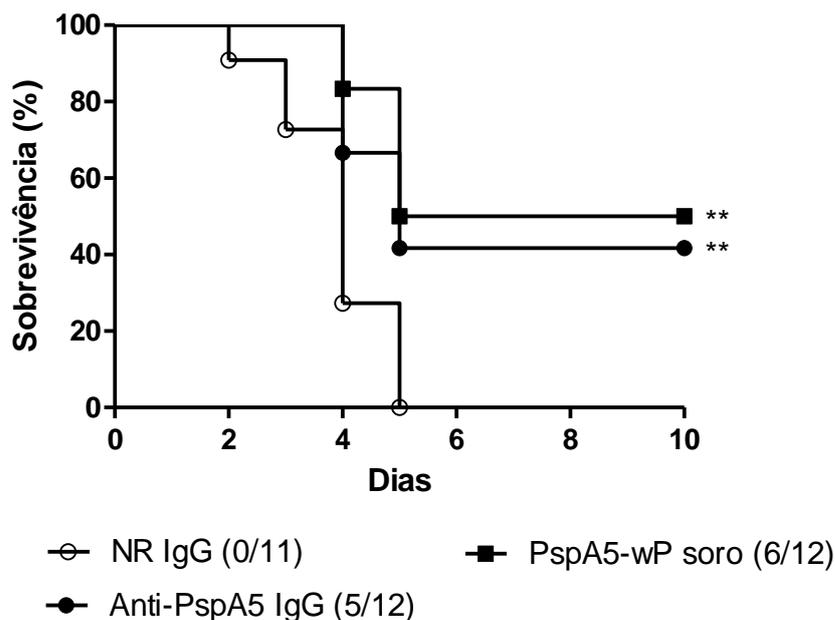
**Tabela 6.** Sobrevivência de camundongos C57BL/6 selvagens ou BKO ( $\mu$ MT) após o desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação do papel dos anticorpos na proteção induzida pela vacina PspA5-wP.

	Grupos	Vivos/ total	% sobrevivência	P*
$\mu$ MT <sup>-/-</sup>	wP	0/4	---	---
	PspA5-wP	0/4	---	1
WT	wP	0/6	---	1
	PspA5-wP	6/6	100	0,005

\*Teste exato de Fisher. Comparações com os respectivos grupos imunizados com wP.

A seguir, foram propostos ensaios de imunização passiva para análise da importância IgG anti-PspA5 na proteção induzida pela vacina PspA5-wP em camundongos submetidos ao desafio com a bactéria ATCC6303.

Os camundongos receberam por via i.p. soro dos camundongos imunizados com PspA5-wP ou IgG purificada a partir deste soro. Como controle negativo, os animais receberam IgG purificada a partir de um soro hiper-imune produzido contra um antígeno não relacionado (Intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica - NR). Duas horas após a inoculação, os animais foram submetidos ao desafio. Os resultados apresentados na Figura 16 mostraram que os grupos imunizados passivamente com o soro dos animais imunizados com PspA5-wP ou com IgG purificada deste soro apresentaram sobrevivência de 50 e 41,7% dos animais, respectivamente, enquanto que o grupo que recebeu a IgG anti-intimina (NR), não apresentou sobreviventes. Estas diferenças se mostraram significativas pela curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ( $P < 0,01$ ).

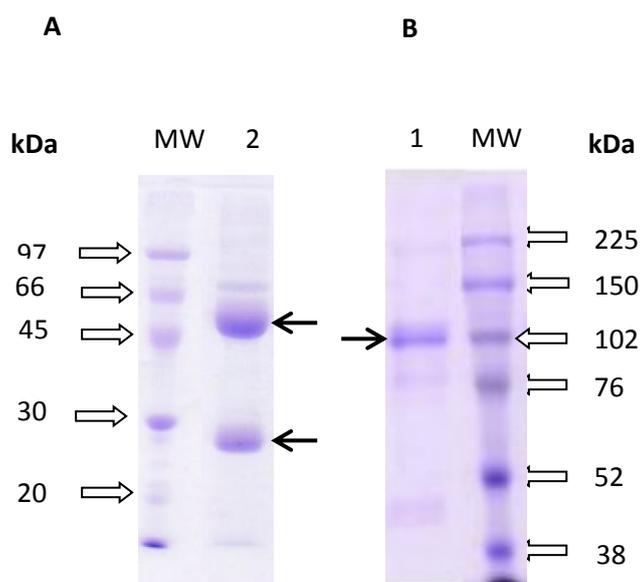


**Figura 16. Sobrevivência após desafio letal com a linhagem ATCC6303 em animais imunizados passivamente com diferentes IgGs purificadas ou soro de camundongos imunizados com PspA5-wP.** Camundongos BALB/c foram submetidos à imunização passiva via i.p. com soro de animais imunizados com PspA5-wP contendo 50 µg de IgG, 50 µg de IgG purificada deste soro ou 50 µg de IgG purificada de soro hiper-imune anti-intimina (NR). Os animais foram desafiados com a bactéria ATCC6303 duas horas após a imunização e observados por 10 dias. Os valores estatisticamente diferentes são indicados pelos asteriscos. \*\*P<0.01 - em relação ao grupo que recebeu IgG NR, curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (log-rank test).

Com o objetivo de caracterizar melhor a função dos anticorpos induzidos pela formulação PspA5-wP na proteção dos animais contra o desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303, foram propostos ensaios de imunização passiva usando o fragmento variável de IgG (Fab')<sub>2</sub> produzido a partir da IgG purificada dos soros dos animais imunizados com PspA5-wP. O objetivo desta estratégia é separar a porção de ligação ao antígeno, sem o fragmento cristalizável (Fc), responsável pela fixação do complemento.

As figuras 17.A e B mostram SDS-PAGEs, em géis de 8 e 12% de acrilamida respectivamente, representativas das purificações de IgG (figura 17.A) e das frações F(ab')<sub>2</sub> (figura 17.B). Todas as purificações de IgG apresentaram um perfil semelhante

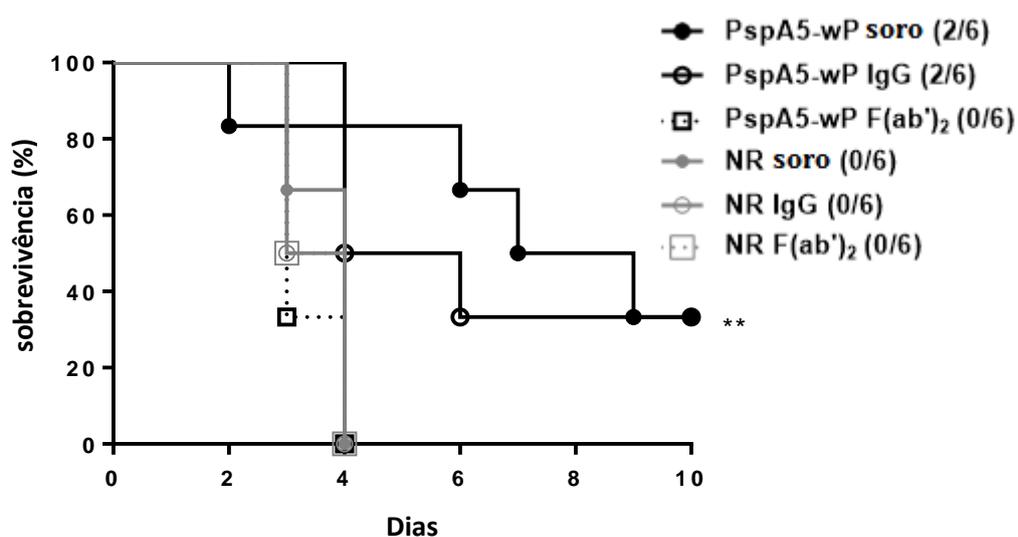
ao demonstrado na canaleta 2 da figura 17.A. As duas bandas observadas correspondem às cadeias leve e pesada dissociadas pelo aquecimento na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, com a massa de 25 e 55 kDa respectivamente. A figura 17.B mostra o perfil obtido na eletroforese da fração  $(Fab')_2$  após o processo de purificação, sem aquecimento prévio nem tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol para a conservação da molécula divalente. Nesta figura pode se observar que a massa está próxima à descrita na literatura para esta fração, 110 kDa.



**Figura 17. SDS-PAGE das purificações de IgG e do fragmento  $F(ab')_2$ .** A, canaleta MW: padrão de massa molecular (Low molecular weight GE-Healthcare). Canaleta 2: IgG purificada a partir do soro de camundongos imunizados com PspA5-wP. B, canaleta 1: Fragmento  $F(ab')_2$  produzido a partir da IgG purificada. Canaleta MW: padrão de massa molecular (Broad -Range Rainbow – GE Healthcare). As setas pretas indicam as bandas de interesse.

Camundongos BALB/c naïve foram inoculados por via i.p. com soro de camundongos imunizados com PspA5-wP contendo 20  $\mu$ g de IgG ou com 20  $\mu$ g de IgG purificada a partir deste soro ou igual massa molar da fração  $F(ab')_2$ . Este experimento foi realizado com uma quantidade menor de IgG, pela dificuldade de produção de grandes quantidades de  $F(ab')_2$ . Os controles receberam as mesmas amostras provenientes de soros de camundongos imunizados com o antígeno não relacionado (NR). Duas horas após o inóculo, os animais foram desafiados com a linhagem de pneumococo ATCC6303. Os grupos que receberam o soro de animais imunizados com PspA5-wP ou a IgG purificada a partir deste soro apresentaram sobrevivência de 33,3 %

dos animais, além de um tempo maior de sobrevivência dos animais. Por outro lado, nenhum dos animais imunizados passivamente com a fração  $F(ab')_2$  produzida a partir da IgG derivada do soro PspA5-wP sobreviveu ao desafio, sendo que todos os animais morreram em até 4 dias após o desafio ( $P=0,01$  quando comparados os grupos imunizados com soro PspA5-wP ou IgG derivada deste soro e o grupo imunizado com  $F(ab')_2$  derivada de PspA5-wP). Nenhuma das amostras derivadas do soro NR produziu algum efeito na sobrevivência dos animais.

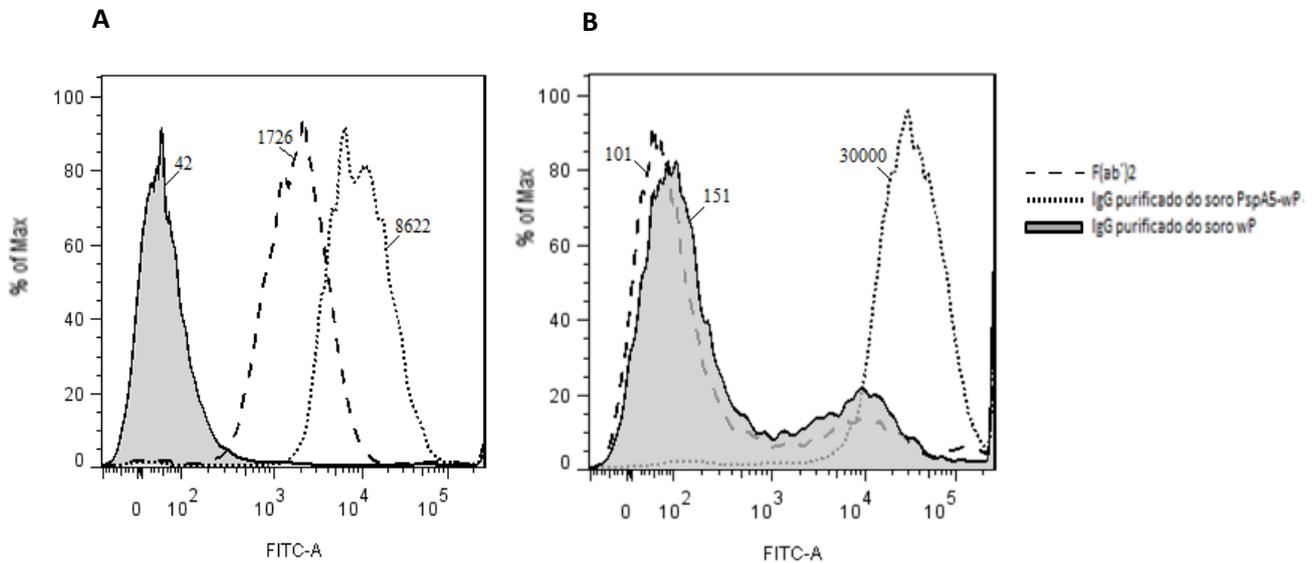


**Figura 18. Sobrevivência após desafio letal com *S. pneumoniae* (ATCC6303) em animais submetidos a imunização passiva.** Duas horas após a imunização os camundongos BALB/c foram desafiados com a bactéria ATCC6303. A sobrevivência foi observada por 10 dias. Os valores estatisticamente diferentes são indicados:  $**P=0,01$  em relação ao grupo que recebeu a porção  $F(ab')_2$  derivada da IgG purificada do soro PspA5-wP, curva de sobrevivência Kaplan-Meier (log-rank test). NR = antígeno não relacionado.

Para validar os resultados obtidos no experimento anterior, a fração  $F(ab')_2$  derivada da IgG do soro PspA5-wP foi testada quanto à capacidade de se ligar à superfície da linhagem de pneumococo ATCC 6303 *in vitro*.

A figura 19.A mostra que a IgG purificada do soro de camundongos imunizados com PspA5-wP e o  $F(ab')_2$  preparado a partir desta IgG foram capazes de se ligar à superfície da bactéria, gerando curvas com medianas de 8622 e 1726 respectivamente.

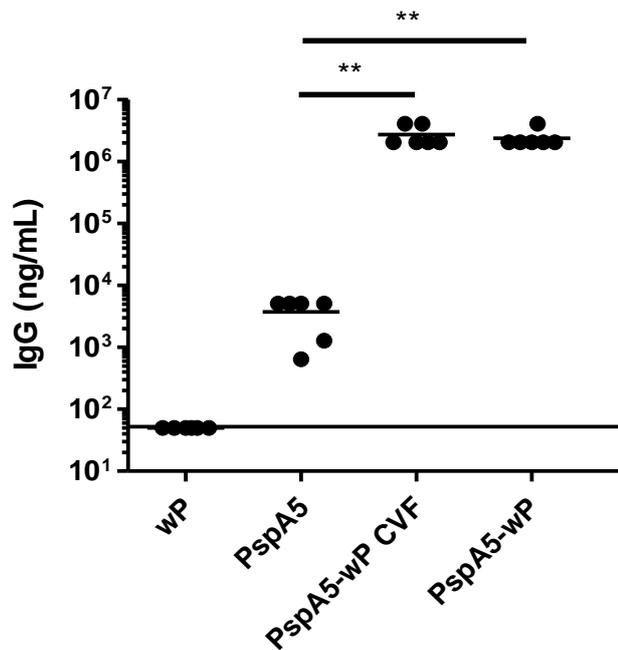
No entanto, apenas a IgG foi capaz de mediar a deposição do complemento na superfície do pneumococo (mediana de 30000) (figura 19.B).



**Figura 19. Ligação de IgG e F(ab')<sub>2</sub> e indução de deposição de complemento na superfície do *S. pneumoniae*.** IgG purificada de soro de animais imunizados com PspA5-wP e o correspondente F(ab')<sub>2</sub> foram avaliados quanto a capacidade de se ligar à superfície de *S. pneumoniae* (A) e de induzir deposição do componente C3 *in vitro* (B) por citometria de fluxo. Como controle negativo, foi utilizada IgG purificada de soro de camundongos imunizados com wP. A mediana da intensidade de fluorescência é mostrada na figura para os diferentes grupos.

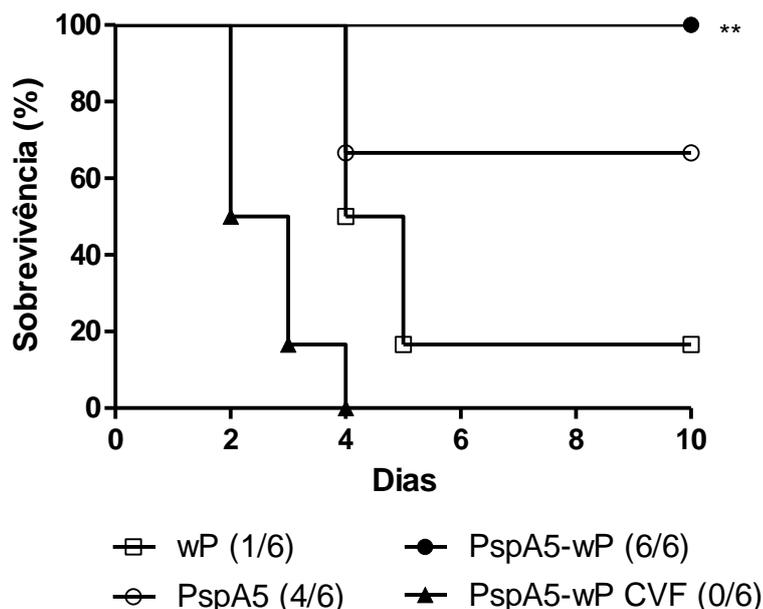
#### 4.2.1 Papel das proteínas de complemento na sobrevivência de camundongos BALB/c contra o desafio letal com a bactéria ATCC6303

Para confirmar o papel do complemento na proteção induzida pela vacina PspA5-wP, camundongos BALB/c foram imunizados com seis doses das formulações wP, PspA5 ou PspA5-wP e, vinte dias após a última dose, o soro foi coletado para dosagem de IgG anti-PspA5. As concentrações de anticorpos anti-PspA5 foram altas para os grupos imunizados com PspA5-wP, e estatisticamente superiores ( $P < 0.01$ ) às concentrações observadas no grupo imunizado com a PspA5 sozinha. Nesse experimento dois grupos receberam a formulação PspA5-wP já que um deles seria tratado com CVF.



**Figura 20. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Camundongos BALB/c foram imunizados por via i.n. com 6 doses das diferentes formulações. Vinte dias após a última dose, os camundongos foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto á presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados representam um experimento, composto por 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a média dos grupos. \*\* $P < 0.01$ , teste de Mann Whitney. A linha indica o limite mínimo de detecção da técnica.

Os animais receberam CVF por via i.p. e, após 24 h, foram submetidos ao desafio com a linhagem de pneumococo ATCC6303. Vinte e quatro horas após o desafio, os animais receberam uma injeção adicional de CVF. A avaliação da sobrevivência (Figura 21) mostrou que 100 % dos animais imunizados com PspA-wP e não tratados com CVF sobreviveram ao desafio. Por outro lado, nenhum animal do grupo imunizado com PspA5-wP e tratado com CVF sobreviveu ao desafio. É interessante observar que os animais deste grupo morreram mais rapidamente que os animais inoculados apenas com o adjuvante wP. É importante ressaltar que foi realizado um controle onde 2 animais imunizados com PspA5-wP foram tratados com CFV mas não foram desafiados. Estes animais permaneceram saudáveis até o fim do experimento, comprovando assim, que não houve efeito deletério pela aplicação de CVF.



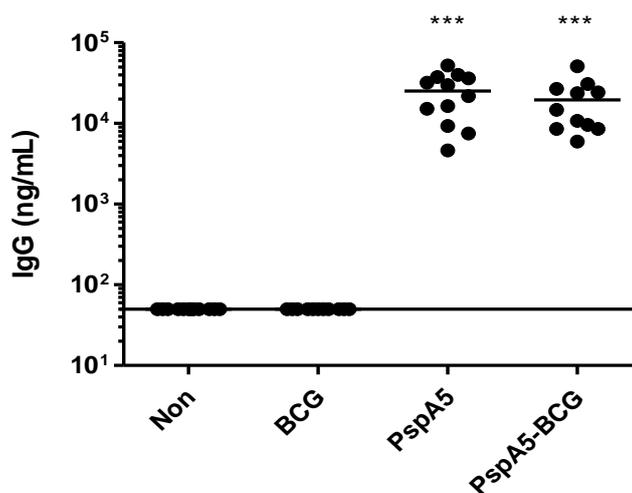
**Figura 21. Sobrevivência após desafio letal com ATCC6303 em animais submetidos a regime vacinal e tratados com Cobra Venom Fator (CVF).** Camundongos BALB/c foram imunizados por via i.n. com 6 doses das diferentes formulações. Vinte e um dias após a última dose, os camundongos foram tratados ou não com CVF, submetidos ao desafio com a bactéria ATCC6303 e observados por 10 dias. Os valores estatisticamente diferentes são indicados pelos asteriscos. \*\* $P < 0,01$  em relação ao grupo imunizado com a formulação PspA5-wP que recebeu CVF, curva de Kaplan Meyer (log-rank test).

#### 4.3 Caracterização das propriedades adjuvantes da vacina BCG em combinação com PspA5 em camundongos BALB/c

Como alternativa à vacina wP, foi proposta também neste trabalho a avaliação do potencial adjuvante da vacina BCG, que também constitui uma vacina composta por bactéria inteira. A combinação de BCG ao antígeno PspA5, constitui uma estratégia interessante já que esta vacina é licenciada para uso em recém nascidos.

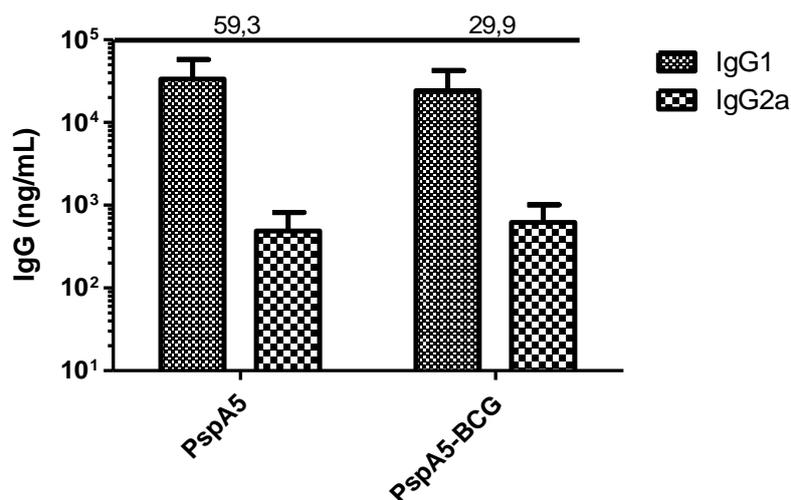
Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com uma dose de PspA5-BCG, contendo 5  $\mu$ g de PspA5 e uma dose humana de BCG ( $1 \times 10^5$  células).

Os grupos controles receberam a PspA5, BCG ou não foram imunizados. Na figura 22 são apresentados os níveis de concentração de anticorpos IgG anti-PspA5 detectados nos soros dos animais imunizados, 20 dias após a imunização. Os grupos que receberam PspA5 ou PspA5-BCG, apresentaram níveis de anticorpos superiores aos níveis observados nos animais não imunizados ou imunizados com BCG ( $P < 0,0001$ ). Por outro lado, os níveis de anticorpos induzidos pela imunização com PspA5 sozinha foram equivalentes aos níveis induzidos pela formulação PspA5-BCG ( $P = 0,34$ ).



**Figura 22. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a única dose, os camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados foram compostos por dois experimentos independentes, com 6 animais por grupo cada. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos. \*\*\*  $P < 0.0001$  em relação ao grupo não imunizado (Non) ou ao grupo que recebeu a BCG sozinha, teste de Mann Whitney. A linha indica o limite mínimo de detecção da técnica.

Os soros foram também avaliados quanto aos níveis de IgG1:IgG2a anti-PspA5. Os resultados (Figura 23) mostraram que a imunização com PspA5 ou PspA5-BCG induziu uma resposta do tipo Th2, com níveis maiores de IgG1. Também foi possível observar que os níveis do subtipo IgG2a detectados para as duas formulações, PspA5 e PspA5-BCG, foram semelhantes.



**Figura 23. Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria retrorbital e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG1 e IgG2a anti-PspA5 por ELISA. Os dados foram compostos por dois experimentos independentes, com 6 animais por grupo cada. As barras representam as médias das concentrações com os desvios padrão. Os números acima das barras são os valores das razões IgG1/IgG2a calculadas para cada grupo.

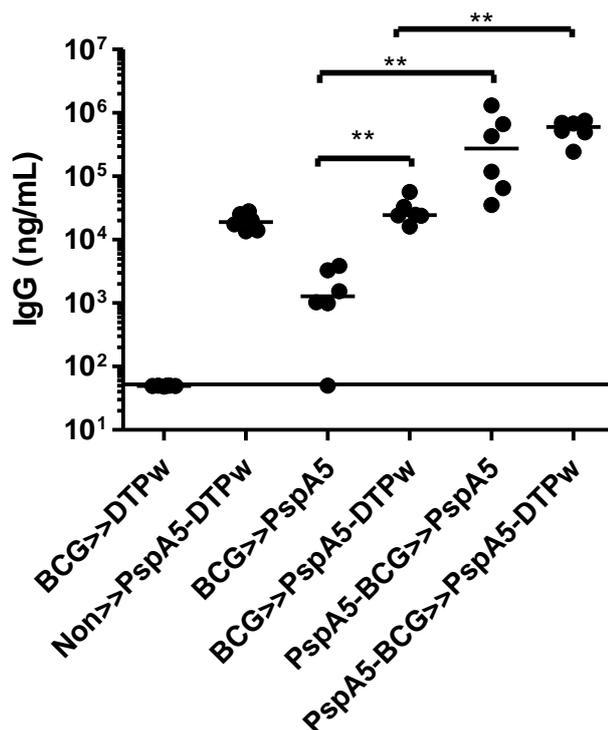
Os animais imunizados com PspA5 ou PspA5-BCG foram desafiados pela via respiratória com a linhagem ATCC6303 de *S. pneumoniae*. A tabela 7 mostra que os camundongos imunizados com PspA5 ou PspA5-BCG, apresentaram sobrevivência de 66,7 % e 50 % respectivamente. A sobrevivência destes dois grupos foi significativamente diferente da observada nos grupos não imunizado (Non) ( $P=0,001$  e  $P=0,01$  respectivamente) ou imunizado com BCG ( $P=0,001$  e  $P=0,01$  respectivamente). Não houve diferença estatística significativa na proteção conferida pela PspA5 sozinha em relação à proteção conferida pela formulação PspA5-BCG,  $P=0,68$ .

**Tabela 7.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação do efeito adjuvante da vacina BCG

Grupos	Vivos/total	% sobrevivência	P*
Non	0/12	0	---
BCG	0/12	0	---
PspA5	8/12	66,7	0,001
PspA5-BCG	6/12	50	0,01

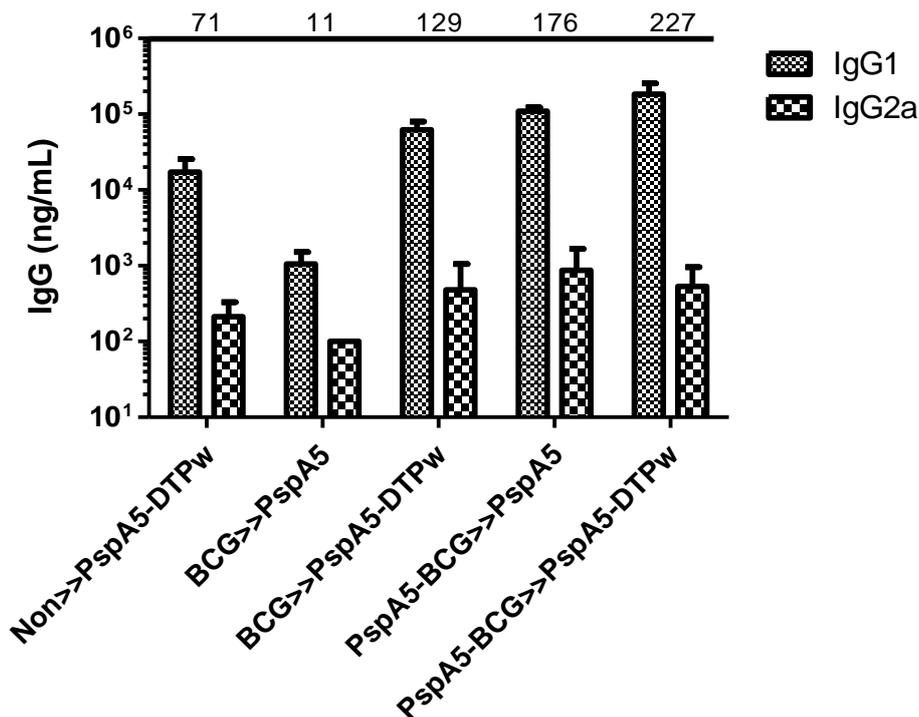
\*Teste exato de Fisher. Comparações com o grupo não imunizado (Non) ou BCG.

A combinação de PspA5 a BCG não alterou significativamente a resposta imune e proteção induzida pela proteína sozinha. Com base nestes resultados, foi proposta a diminuição da dose de PspA utilizada na imunização, de 5 µg para 1 µg e a realização de experimentos de dose-reforço através do uso de BCG e DTPw. Estas estratégias consistiram no uso da vacina BCG como primeira dose em camundongos BALB/c seguido de uma dose reforço com a vacina DTPw. A proteína PspA5 foi incluída na primeira e/ou segunda dose do esquema vacinal, segundo os grupos apresentados na figura 24. Para os grupos que receberam apenas BCG na primeira dose, o reforço com PspA5-DTPw (BCG>>PspA5-DTPw) produziu níveis significativamente mais altos de IgG anti-PspA5 do que o reforço com a proteína sozinha (BCG>>PspA5). Entretanto, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos observados no grupo BCG>>PspA5-DTPw e o grupo que recebeu apenas a dose de PspA5-DTPw (Non>>PspA5-DTPw). A combinação de PspA5 e BCG na primeira dose, seguida de reforço com PspA5 na segunda dose (PspA5-BCG>>PspA5) produziu níveis similares de anticorpos em comparação ao regime PspA5-BCG>>PspA5-DTPw. Entretanto, este último grupo apresentou menor dispersão dos dados. Por fim, a presença de PspA5 nas duas doses e em combinação com as vacinas celulares (PspA5-BCG>>PspA5-DTPw) aumenta significativamente os níveis de IgG anti-PspA5, em relação ao grupo que recebe apenas uma dose de PspA5 (BCG>>PspA5-DTPw).



**Figura 24. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, os camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Dados de um experimento com grupos compostos por 6 animais cada. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos. \*\*  $P < 0,01$ , teste de Mann Whitney. A linha determina o limite mínimo de detecção da técnica

A figura 25 apresenta o perfil dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, nos diferentes grupos. A resposta para a maioria dos grupos foi do tipo Th2, com níveis superiores de IgG1 em relação a IgG2a, com exceção do grupo imunizado com BCG->PspA5. Neste grupo, apesar de observarmos ainda uma tendência para Th2 a razão IG1:IgG2a foi mais equilibrada.



**Figura 25. Indução dos subtipos de IgG, IgG1 e IgG2a, anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a imunização, camundongos BALB/c foram submetidos a sangria e os soros foram avaliados quanto à presença de IgG1 e IgG2a anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados correspondem a um experimento, com 6 animais por grupo. As barras representam as médias das concentrações com os desvios padrão. Os números acima das barras são os valores das razões IgG1/IgG2a calculadas para cada grupo.

Vinte e um dias após a última dose os camundongos foram submetidos ao desafio respiratório invasivo com a linhagem de pneumococo ATCC6303. Os dados da tabela 8 mostram que, entre os grupos que receberam apenas BCG na primeira dose, a proteção foi significativamente superior quando o reforço com PspA5 foi combinado a DTPw. Nenhum animal do grupo vacinado com BCG>>PspA5 sobreviveu ao desafio, enquanto que a vacinação com BCG>>PspA5-DTPw levou à sobrevivência de 83,3 % dos animais. Ainda, a sobrevivência observada no grupo que recebeu o regime BCG>>PspA5-DTPw foi ligeiramente superior ao grupo vacinado apenas com PspA5-DTPw (Non>>PspA5-DTPw). Entretanto, estes dados não apresentam diferenças significativas. Ambos os grupos que receberam PspA5 nas duas doses (BCG-PspA5>>PspA5 e BCG-PspA5>>PspA5-DTPw) apresentaram níveis significativos de proteção, com 100 % e 83,3 % de sobreviventes, respectivamente.

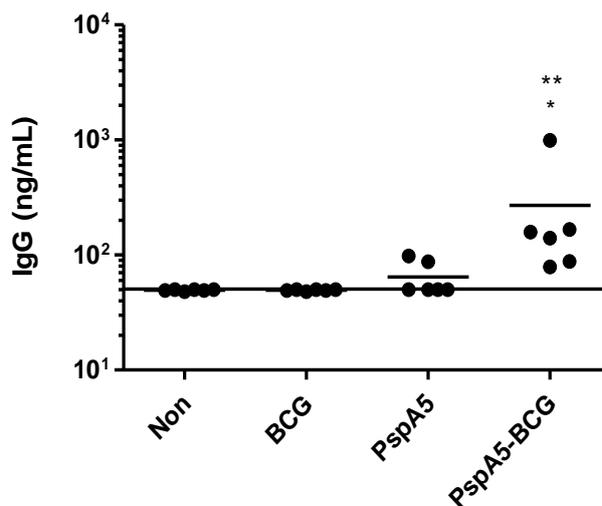
**Tabela 8.** Sobrevivência de camundongos BALB/c após o desafio com *S. pneumoniae* ATCC6303. Avaliação do efeito adjuvante das vacinas BCG e DTPw combinadas a PspA5.

Grupos	Vivos/total	% sobrevivência	P*
<b>BCG&gt;&gt;DTPw</b>	0/6	0	---
<b>Non&gt;&gt;PspA5-DTPw</b>	3/6	50	0,18
<b>BCG&gt;&gt;PspA5</b>	0/6	0	1
<b>BCG&gt;&gt;PspA5-DTPw</b>	5/6	83,3	0,015
<b>PspA5-BCG&gt;&gt;PspA5</b>	6/6	100	0,0022
<b>PspA5-BCG&gt;&gt;PspA5-DTPw</b>	5/6	83,3	0,015

\*Teste exato de Fisher. Comparações com o grupo BCG>>DTPw.

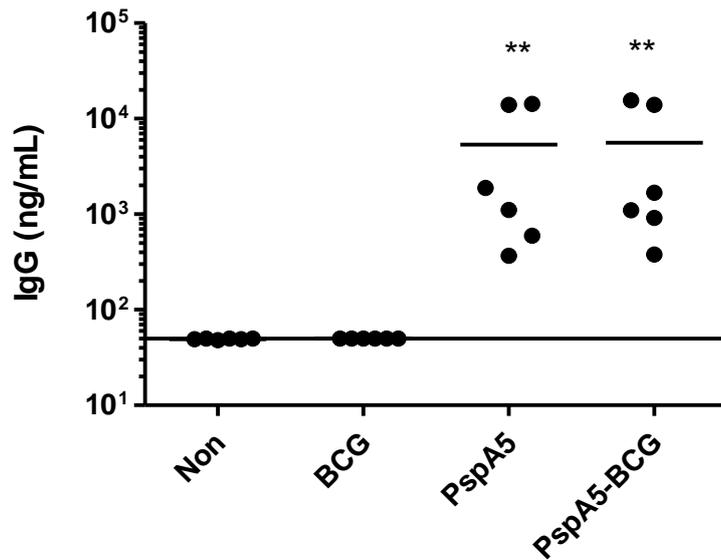
A seguir foi avaliada a capacidade protetora da formulação PspA5-BCG contra a linhagem de *S. pneumoniae* 0603, que expressa PspA do clado 1 (PspA1) em modelo de desafio de colonização em camundongos C57BL/6.

Neste ensaio os animais foram imunizados com duas doses pela via s.c., sendo a primeira dose composta por 1 µg de PspA5 e uma dose humana de BCG e, a segunda dose, por 1 µg da proteína PspA5 sozinha. Os grupos controles receberam PspA5, BCG ou não foram imunizados (Non). A figura 26 apresenta as concentrações de IgG anti-PspA5 detectadas nos diferentes grupos após receber a primeira dose do esquema vacinal proposto. Pode-se observar que o uso de uma menor concentração de PspA5 (1 µg) deixou mais evidente a ação adjuvante de BCG já que o grupo que recebeu a formulação combinada, PspA5-BCG, foi estatisticamente superior a todos os grupos, incluindo o grupo que recebeu a PspA5 sozinha ( $P < 0,05$ ) ou os outros grupos ( $P < 0,01$ ).



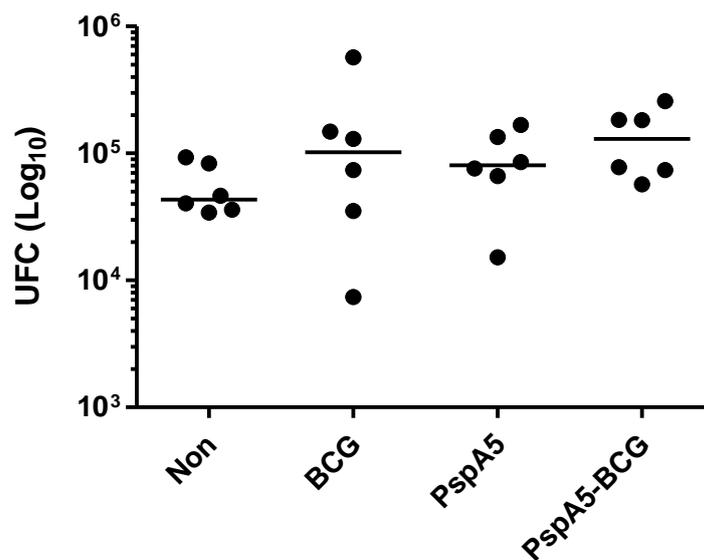
**Figura 26. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Quatorze dias após a primeira imunização, os camundongos C57BL/6 foram submetidos a sangria e os soros avaliados quanto à presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados correspondem a um experimento com 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos. \*  $P < 0,05$  com relação ao grupo imunizado com PspA5. \*\* $P < 0,01$  em relação aos outros grupos, teste de Mann Whitney. A linha indica o limite mínimo de detecção da técnica.

Quatorze dias após a primeira dose, o esquema de imunização dos camundongos foi reforçado pela inoculação de  $1\mu\text{g}$  da proteína PspA5, também pela via s.c. A figura 27 mostra os resultados obtidos na avaliação da produção de IgG anti-PspA5, duas semanas após o reforço. O grupo que recebeu a proteína PspA5 apresentou níveis de IgG anti-PspA5 em concentrações equivalentes às detectadas no grupo que recebeu a PspA5 em combinação a BCG na primeira imunização. Os níveis de IgG anti-PspA5 destes dois grupos foram significativamente mais altos que os níveis observados no grupo controle não imunizado (Non),  $P < 0,01$ .



**Figura 27. Indução de IgG anti-PspA5 em animais imunizados com as diferentes formulações.** Vinte dias após a última imunização, os camundongos C57BL/6 foram submetidos a sangria e os soros avaliados à presença de IgG anti-PspA5 por ELISA. Os dados mostrados correspondem a um experimento, composto por 6 animais por grupo. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos. \*\*  $P < 0.01$  em relação ao grupo não imunizado (Non), teste de Mann Whitney. A linha indica o limite mínimo de detecção da técnica.

Vinte e um dias após a segunda dose, foi realizado o desafio de colonização, via nasal, com a linhagem 0603 de *S. pneumoniae*. Os animais foram submetidos à eutanásia, 5 dias após o desafio e a carga bacteriana nos lavados nasais foi avaliada. A figura 28 mostra os resultados do número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas. Não houve diferença no número de UFCs recuperadas entre os grupos.



**Figura 28.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)- presentes nos lavados nasais de camundongos imunizados com as diferentes formulações. Os pontos indicam os dados individuais e a linha representa a mediana dos grupos. Os dados mostrados correspondem a um experimento. Não houve valores estatisticamente diferentes entre os diferentes grupos, teste de Mann Whitney.

## 5 Discussão

Vacinas proteicas têm sido estudadas como alternativas às atuais vacinas contra *Streptococcus pneumoniae*, que são baseadas em polissacarídeos capsulares (PS). A baixa reatividade cruzada entre estes polissacarídeos implica no cultivo de diferentes sorotipos de pneumococo e purificação dos respectivos polissacarídeos, tornando o método trabalhoso. Além disso, a necessidade de conjugação com carreadores proteicos para a indução de resposta imune dependente de células T, eficaz em crianças, limita o número de polissacarídeos incluídos nas formulações e encarece o processo. Estes fatores, aliados às observações de substituições dos sorotipos circulantes em populações vacinadas, após alguns anos de uso das vacinas conjugadas, estimulam a busca de alternativas. O antígeno PspA é um dos principais candidatos estudados, apresentando resultados importantes em diferentes modelos animais de infecção por pneumococo (Miyaji, Oliveira et al., 2013). No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos com PspA, é necessária a proposta para uso de novos adjuvantes, adequados para uso humano, que permitam a estimulação de uma resposta imune eficaz com poucas doses da vacina.

O nosso grupo testou a atividade adjuvante de vacinas pertussis, wP e wP<sub>low</sub> (vacina de nova geração, desenvolvida pelo Instituto Butantan, na qual o excesso de LPS foi removido) em combinação a PspA5 recombinante por via nasal em camundongos. Ambas as vacinas estimularam a alta produção de anticorpos PspA5 específicos sistêmicos e de mucosa e proteção contra desafios letais respiratórios e também contra desafios de colonização (Oliveira, Miyaji et al., 2010). Além disso, a formulação PspA5-wP foi capaz de proteger camundongos da linhagem C3H/HeJ, que não possuem a sinalização por LPS, via receptor do TLR-4. Estes dados sugeriram, que a atividade adjuvante exercida pela wP neste modelo não é dependente da presença do LPS. Neste trabalho, foi proposta a caracterização dos componentes da vacina wP que participam da atividade adjuvante neste modelo.

Avanços na pesquisa, incluídas as baseadas em genômicas, têm sugerido que a complexidade da patogenicidade de *B. pertussis* envolve diferentes fatores de virulência, entre eles toxinas e adesinas. A produção da grande maioria destes fatores é

regulada pelo sistema de dois componentes BvgA/S. Acredita-se que este sistema seja diferencialmente regulado pela bactéria durante as fases da infecção por *B. pertussis*. Com base nesta hipótese, a fase denominada Bvg<sup>-</sup> onde a expressão de diferentes fatores de virulência é baixa, corresponde a uma fase “*ex vivo*”. Durante a transmissão, a ativação de BvgAS estaria na fase intermediária (Bvg<sup>i</sup>), com a expressão de alguns fatores importantes, sendo as adesinas as principais. Por fim, durante a fase *in vivo*, BvgAS estaria na fase completamente ativa (Bvg<sup>+</sup>), onde há a expressão das adesinas e de outros fatores de virulência, como PT e ACT. A modulação do sistema BvgAS de *B. pertussis* pode ser observada *in vitro* através de alterações em condições de cultivo (Melvin, Scheller et al., 2014). A avaliação inicial neste trabalho consistiu no uso da linhagem mutante mais atenuada, a BPLOW, que apresenta deleções em regiões do regulon *bvgA/bvgS*, as quais resultam em baixa expressão de diferentes fatores de virulência, entre eles a toxina pertussis (PT) e a hemaglutinina filamentosa (FHA).

Os experimentos iniciais utilizando as diferentes *B. pertussis* mostraram que a ação adjuvante em combinação a PspA5 não foi dependente da linhagem utilizada, já que a vacina wP, produzida pelo Instituto Butantan, é derivada da linhagem NIH137, e a BPSM é derivada da linhagem TohamaI. Ambas apresentaram ação adjuvante similar quando combinadas a PspA5, induzindo altos níveis de anticorpos e proteção contra o desafio respiratório invasivo com pneumococo. Por outro lado, a combinação de PspA5 a BPLOW, apesar de induzir níveis significativamente mais altos de anticorpos do que a proteína sozinha, foi significativamente inferior quando comparada às vacinas PspA5-wP e PspA5-BPSM. A formulação PspA5-BPLOW conferiu proteção parcial, com sobrevivência de 50 % dos animais. Estes resultados indicam que a baixa expressão dos diferentes fatores de virulência, como PT e FHA, limitou a propriedade adjuvante exercida pela BPLOW. Assim, estes fatores foram apontados como candidatos a adjuvantes em combinação a PspA5.

A combinação de PspA5 a BPRA, linhagem que apresenta deleção no gene *ptx* que codifica PT, induziu níveis significativamente mais baixos de IgG anti-PspA5 que as formulações PspA5-wP e PspA5-BPSM. Além disso, a formulação PspA5-BPRA não foi capaz de conferir proteção aos animais vacinados. Assim, a ausência da PT compromete significativamente a atividade adjuvante de *B. pertussis*, sugerindo que o efeito adjuvante observado neste modelo é devido, pelo menos, em parte a PT.

Estes resultados nos levaram a testar alguns componentes purificados de *B. pertussis* como adjuvantes em combinação a PspA5. Os três componentes escolhidos para esta análise, PT, ACT e FHA agem como imunomoduladores durante a infecção por pertussis (Melvin, Scheller et al., 2014) e já foram descritos como adjuvantes em combinação a antígenos heterólogos (Roberts, Bacon, 1995; Poulain-Godefroy, Menozzi et al., 2003; Macdonald-Fyall, Xing et al., 2004; Orr, Douce et al., 2007; Carbonetti, 2010). Dos três componentes testados, PT apresentou a melhor atividade adjuvante. A imunização dos camundongos com uma dose nasal de PspA5-PT induziu altos níveis de IgG anti-PspA5 no soro dos animais e conferiu elevada proteção, com 80 % a 100 % de sobreviventes dos animais vacinados, após o desafio respiratório invasivo com pneumococo. Estes níveis foram equivalentes aos observados nas composições contendo bactérias selvagens (PspA5-wP e PspA5-BPSM). FHA também apresentou um efeito adjuvante importante quando combinado a PspA5, porém, induzindo níveis mais baixos de IgG anti-PspA5, se comparado à ação de PT, e proteção parcial, com sobrevivência de 50 % dos animais vacinados.

A toxina ACT não exerceu efeito adjuvante quando combinado a PspA5, nas condições testadas. Trabalhos prévios demonstraram a ação adjuvante de ACT por via nasal, quando combinada a antígenos como ovalbumina e pertactina. Uma possível razão para esta diferença pode ser o uso de uma única dose, contendo 1 µg de ACT combinado a PspA5 em nosso trabalho, enquanto o outro estudo usou três doses contendo 10 µg de ACT combinada aos antígenos (Orr, Douce et al., 2007).

O mecanismo da ação adjuvante de PT não é bem conhecido. É possível que a PT apresente um mecanismo semelhante ao das toxinas colérica (CT - produzida por *Vibrio cholerae*) e termo-lábel (LT - produzida por *E. coli*), que também são exotoxinas heterohexaméricas do tipo AB<sub>5</sub>. Estas toxinas, CT e LT, além de ter uma ação tóxica semelhante ao da PT, também atuam como um imunógeno e adjuvante de mucosa induzindo IgG e IgA contra antígenos co-administrados por via nasal, oral ou parental (Holmgren, Adamsson, 2005). Alguns efeitos desencadeados pelas toxinas CT e LT sugerem os mecanismos das propriedades adjuvantes destas moléculas: I) Aumento da permeabilidade epitelial com conseqüente elevação na captação dos antígenos co-administrados, II) Aumento na capacidade de apresentação de antígenos por várias

células apresentadoras de antígenos (APCs). III) capacidade de promover a diferenciação isotípica de células B levando a uma produção aumentada de IgG e IgA e IV) Efeitos estimulatórios e inibitórios complexos sobre a proliferação de células T e produção de citocinas (Holmgren, Adamsson et al., 2005). Vários trabalhos caracterizaram as propriedades exercidas pela PT em diferentes células do sistema imunológico. Por exemplo, os linfócitos T CD8+, derivados do baço de camundongos, ao serem estimuladas *in vitro* com PT apresentam aumento na expressão dos receptores CD28 e CD69 e na expressão de IFN- $\gamma$ , granzima B e IL-17 (Murphey, Chang et al., 2011). *In vitro* foi demonstrado que a PT é capaz de estimular a expressão das moléculas co-estimulatórias CD40, CD83e CD86 e do MHC classe II em células dendríticas (Wang, Yang, 2006). Em nosso trabalho, decidimos avaliar o papel da atividade enzimática de PT na ação adjuvante em combinação a PspA5. A primeira estratégia foi a purificação da PT originária da linhagem BPDR-RE, que apresenta substituições de aminoácidos que eliminam a atividade enzimática sem causar alterações na estrutura. Foi realizada a interrupção do gene que codifica a ACT na linhagem BPDR-RE, com o objetivo de eliminar possíveis atividades residuais no produto purificado. Entretanto, as diversas tentativas de purificação por cromatografia de afinidade não resultaram na PT-RE pura, havendo vários contaminantes na preparação.

Como alternativa, foi proposto o uso da subunidade B de PT, em pentâmero (Oligômero B), que pode ser obtida comercialmente. Em combinação a PspA5, o Oligômero B (OligB) foi tão eficiente quanto a PT em induzir a altos níveis de IgG anti-PspA5 e proteção dos animais após o desafio respiratório invasivo com *S. pneumoniae*. Assim, em nosso modelo, a atividade enzimática de PT também parece não ser essencial para a ação adjuvante.

Em concordância com os nossos resultados, na literatura são encontradas revisões relatando que embora muitos dos efeitos da PT sejam dependentes da atividade de ADP-ribosilação da proteína Gi, existem efeitos independentes desta atividade nos quais o OligB, é responsável. As regiões N-terminal das subunidades S2 e S3 detêm propriedades de adesão celular. Foi demonstrado, em mutantes deficientes para a expressão de PT, que a reconstituição da expressão de S2 restaura a capacidade de ligação da bactéria às células ciliadas, enquanto que S3 restaura a ligação a macrófagos. (Locht, Coutte et al., 2011; Mangmool and Kurose, 2011). Assim, é possível que a

somatória destas propriedades inerentes do pentâmero e as diferenças na ligação das subunidades expliquem a ação adjuvante. Em experimentos *in vitro*, o oligB foi capaz de estimular a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> humanos e a maturação de células dendríticas humanas (Alfano, Grivel, 2005; Wang, Yang et al., 2006). Apesar de ainda não ser bem esclarecido o mecanismo pelo qual o OligB é capaz de estimular diferentes tipos celulares, este pentâmero exerceu um ótimo papel como adjuvante em combinação a PspA5 em nosso modelo.

O processo de inativação da vacina wP é realizado por tratamento com formaldeído. Vários estudos mostraram o efeito deste tratamento na estrutura e atividade da PT (Fowler, Xing, 2003; Oh, Kim, 2013). Diferentes concentrações de formaldeído podem afetar diferentemente a atividade enzimática ou de ligação a carboidratos e a presença de epítomos nativos (Fowler, Xing et al., 2003; Oh, Kim et al., 2013). Além disso, reversão dos efeitos do formaldeído em vacinas pertussis celulares, principalmente com relação à capacidade de ligação a carboidratos exercida pela PT, foi observada (Oh, Kim et al., 2013). Estes estudos demonstram a importância do balanço entre baixa toxicidade e imunogenicidade para o desenvolvimento de vacinas pertussis contendo PT. Em nossos estudos, nós não avaliamos as propriedades da PT nas preparações de *B. pertussis* inativadas com formaldeído. Entretanto, o fato do mutante BPRA (deficiente para expressão de PT) apresentar atividade adjuvante reduzida em nosso modelo, quando comparado às preparações baseadas em bactérias selvagens (BPSM ou wP), sugere que o tratamento com formaldeído nestas preparações não afetou a atividade adjuvante da PT de forma significativa. Estes dados, em conjunto com a ação adjuvante apresentada por PT e pelo OligB purificados, apontam para o papel essencial de PT neste modelo.

Diferentes estudos mostram a importância da indução de IgG2a para a resposta imune protetora contra PspA, pela maior capacidade de fixar complemento (Arulanandam, Lynch et al., 2001; Ferreira, Darrieux et al., 2008). Ao avaliar a resposta imune induzida por todas as formulações testadas, não foram observados balanços IgG1:IgG2a que fossem mais favoráveis, segundo este parâmetro. Todas as formulações induziram preferencialmente a produção de IgG1. Entretanto, na presença de níveis mais altos de IgG, compreendendo tanto IgG1 como IgG2a, induzidos principalmente pelas formulações PspA5-wP, PspA5-BPSM, PspA5-PT e PspA5-OligB a proteção

contra o desafio respiratório invasivo foi observada. É possível que os níveis altos de anticorpos tenham compensado o balanço.

O papel dos anticorpos na proteção conferida pelas vacinas compostas por PspA é bastante conhecido. Anticorpos anti-PspA são capazes de reverter a inibição da deposição de complemento na superfície da bactéria, exercida pela proteína, levando à fagocitose por macrófagos *in vitro* (Mukerji, Mirza, 2012; Ren, Li et al., 2012). Diversas composições de vacinas baseadas em PspA foram testadas em modelos animais e, em muitas delas, a indução de anticorpos foi observada, com efeito protetor em diferentes modelos de desafio por pneumococo (Miyaji, Oliveira et al., 2013). PspA já foi testado em ensaios clínicos em humanos, induzindo altos níveis de anticorpos com reatividade cruzada contra moléculas de diferentes clados. É interessante ressaltar que os anticorpos anti-PspA produzidos em humanos imunizados foram capazes de proteger camundongos contra um desafio letal por pneumococo (Briles, Hollingshead, 2000; Nabors, Braun, 2000). Por outro lado, camundongos vacinados com PspA5-wP por via nasal, além de apresentarem altos níveis de IgG anti-PspA5, apresentam também um influxo aumentado de células para o trato respiratório, logo após o desafio, que é rapidamente controlado. Este influxo é caracterizado por linfócitos B, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, além de neutrófilos (Lima, Ferreira, 2012). Além disso, os animais vacinados com PspA5-wP apresentam um aumento de secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ ) no trato respiratório logo após o desafio, mas esta resposta inflamatória é controlada em poucas horas. A depleção de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> ou células B no momento do desafio com a linhagem ATCC6303, em camundongos imunizados com PspA5-wP, não afetam a proteção. Assim, a presença destas células no momento do desafio não parece ser essencial à proteção em condições de altos níveis de anticorpos (Lima, Ferreira et al., 2012). Para caracterizar melhor os efetores da proteção induzida pela vacina PspA5-wP, contra o desafio respiratório invasivo com pneumococo, foram realizados no presente trabalho alguns experimentos com enfoque no papel da IgG anti-PspA5 e no sistema complemento. Em ensaios *in vitro*, foi possível observar que os soros dos camundongos que apresentaram os maiores níveis de IgG anti-PspA5 (imunizados com PspA5-BPSM, PspA5-wP ou PspA5-PT) apresentaram maior capacidade de ligação e maior indução da deposição de complemento C3 à superfície da bactéria. Estas formulações foram também as que

induziram proteção significativa dos animais, após o desafio respiratório invasivo com o *S. pneumoniae*

A ausência de proteção contra o desafio respiratório invasivo com pneumococo em camundongos que apresentam deficiência na maturação de células B (linhagem  $\mu\text{MT}^{-/-}$ ), e, conseqüentemente são incapazes de produzir anticorpos, vacinados com PspA5-wP reforça a importância dos anticorpos neste modelo. Além disto, a imunização passiva de animais naïve com IgG purificada e soro de animais vacinados com PspA5-wP foi suficiente para conferir proteção significativa contra o desafio por pneumococo, com aumento no número de animais sobreviventes e no tempo de sobrevivência após o desafio. Por outro lado, a imunização passiva com o fragmento variável de IgG (Fab')<sub>2</sub>, derivado de animais vacinados com PspA5-wP, não foi capaz de produzir este efeito. Estes resultados indicam que além da ligação do anticorpo no PspA presente na superfície da bactéria é necessária a presença do fragmento Fc (responsável pela fixação de componentes do sistema complemento) para a indução da proteção.

Recentemente, o mecanismo pelo qual PspA interfere na deposição de complemento na superfície da bactéria foi descrito. O ancoramento de PspA se dá através da interação com resíduos de fosfocolinas presentes na superfície da bactéria. Esta interação inibe a ligação da proteína C reativa, um importante ativador da cascata de complemento, aos resíduos de fosfocolinas, resultando na diminuição da deposição de complemento na superfície das bactérias (Mukerji, Mirza et al., 2012). Entretanto, anticorpos protetores contra PspA mapeiam na região N-terminal da molécula, fora do domínio de interação com os resíduos de colina (McDaniel, Ralph et al., 1994). Os autores discutem que o efeito dos anticorpos anti-PspA na indução da deposição de complemento na superfície da bactéria se deve, provavelmente, à ativação da via clássica do complemento, através da ligação do componente C1q no fragmento Fc dos anticorpos (Mukerji, Mirza et al., 2012). O fragmento de PspA5 utilizado neste trabalho, que compreende a região N-terminal, incluindo o domínio de prolinas, foi capaz de induzir resposta protetora. Além disso, foi demonstrado em nossos experimentos o papel do Fc da IgG induzida pela vacina PspA5-wP, contra o desafio respiratório invasivo por pneumococo. Assim, os experimentos aqui apresentados corroboram esta hipótese.

Por fim, a depleção das proteínas do complemento em camundongos imunizados com repetidas doses de PspA5-wP, e que apresentam altos níveis de IgG anti-PspA5, aboliu a proteção da vacina contra o desafio respiratório invasivo com o pneumococo, confirmando a importância do sistema complemento neste modelo.

Em imunizações de camundongos por via subcutânea, nosso grupo demonstrou que a formulação PspA5-DTPw é capaz de induzir altos níveis de IgG anti-PspA5 e proteger os animais contra desafios respiratórios letais com pneumococos expressando PspAs de dois clados diferentes (Oliveira, Miyaji et al., 2010). Além disso, a combinação a PspA5 não interfere com a resposta imune induzida pelos 3 componentes da DTPw (Lima, Miyaji, 2013). Por ser uma vacina composta por bactéria inteira e segura para o uso em recém nascidos, a vacina BCG é também uma forte candidata para formulações combinadas. BCG já foi testado como vetor carreador para PspA em modelos animais. A imunização com BCG recombinante capaz de secretar PspA induziu anticorpos anti-PspA em camundongos BALB/c, que foram capazes de proteger camundongos imunodeficientes, contra desafios letais com pneumococo, em experimentos de imunização passiva. (Langermann, Palaszynski, 1994).

Nos experimentos realizados neste trabalho, a imunização de camundongos com BCG combinado a PspA5, por via subcutânea, induziu níveis de IgG anti-PspA5 similares aos observados para a imunização com a proteína sozinha. Além disso, ambas as formulações, PspA5 e BCG-PspA5 induziram a sobrevivência parcial dos animais, em porcentagens bastante similares. Estes resultados indicam que apesar de BCG não apresentar um efeito adjuvante neste esquema de imunização, no que concerne ao tipo de resposta imune avaliado, não houve prejuízo desta resposta ao antígeno PspA5.

Em ensaios de dose reforço, utilizando BCG em combinação ou não a PspA5 seguido de reforço com PspA5 ou PspA5 combinado a DTPw observamos uma forte resposta, principalmente nos regimes de reforço na presença de DTPw (BCG>>PspA5-DTPw ou PspA5-BCG>>PspA5-DTPw) ou no uso de duas doses de PspA5 (PspA5-BCG>>PspA5). Estas formulações foram capazes de estimular a produção de altos níveis de IgG anti-PspA5 e de induzir proteção significativa contra o desafio respiratório invasivo com pneumococo.

Apesar da indução de IgG anti-PspA5 a vacina PspA5-BCG, mesmo após um reforço com PspA5 não foi capaz de proteger os animais contra o desafio por colonização com a linhagem de pneumococo 603, que expressa PspA1. Em trabalho anterior, a combinação de PspA5 a wP por via nasal, foi capaz de conferir proteção neste modelo (Oliveira, Miyaji et al., 2010). É possível que outros componentes da resposta imune, induzidos por PspA5-wP, como por exemplo IgA anti-PspA5 na mucosa respiratória, sejam importantes para a proteção. Estes componentes não foram avaliados no presente trabalho.

Os dados apresentados no presente trabalho contribuem para o conhecimento dos mecanismos da ação adjuvante da *B. pertussis*. A definição de PT como um bom adjuvante em combinação a PspA5 e mesmo o efeito adjuvante mais leve, como o observado para a combinação com FHA, sugerem que vacinas pertussis acelulares podem também ser bons candidatos. Os resultados promissores dos experimentos de dose reforço usando BCG e DTPw estimulam mais estudos para propostas de combinações vacinais com PspA adequadas para uso humano.

## 6 Conclusões

A toxina pertussis (PT) é um componente importante na propriedade adjuvante da wP e de composições compostas por *B. pertussis* inativadas.

Neste modelo, PT e o domínio de ligação a glicoproteínas OligB apresentaram atividade adjuvante similar à observada para wP, sugerindo que a atividade enzimática de PT não é essencial.

A proteção é dependente da indução de altos níveis de IgG anti-PspA5 e anticorpos induzidos pela vacina PspA5-wP são capazes de aumentar significativamente a sobrevivência dos animais.

A proteção é dependente do fragmento cristalizável (Fc) da IgG, responsável pela fixação do complemento.

Na ausência de complemento, os altos níveis de IgG não são capazes de conferir proteção.

A combinação de PspA5 a BCG não altera significativamente a resposta imune e proteção conferida pela proteína sozinha, contra o desafio respiratório invasivo. Entretanto, esquemas de dose reforço, utilizando a combinação PspA5-DTPw se mostraram altamente eficazes.

Os resultados deste trabalho confirmam o potencial uso de vacinas celulares, aprovadas para uso humano, como adjuvantes para PspA.

**REFERÊNCIAS\***

Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods*. 1990;132(2):191-5.

Alfano M, Grivel JC, Ghezzi S, Corti D, Trimarchi M, Poli G, et al. Pertussis toxin B-oligomer dissociates T cell activation and HIV replication in CD4 T cells released from infected lymphoid tissue. *AIDS*. 2005;19(10):1007-14.

Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Locht C. Role of ADP-ribosyltransferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun*. 2001;69(10):6038-43.

Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 2000;182(20):5902-5.

Antoine R, Locht C. Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun*. 1990;58(6):1518-26.

Arulanandam BP, Lynch JM, Briles DE, Hollingshead S, Metzger DW. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2001;69(11):6718-24.

Berstad AK, Andersen SR, Dalseg R, Dromtorp S, Holst J, Namork E, et al. Inactivated meningococci and pertussis bacteria are immunogenic and act as mucosal adjuvants for a nasal inactivated influenza virus vaccine. *Vaccine*. 2000;18(18):1910-9.

Berstad AK, Holst J, Froholm LO, Haugen IL, Wedege E, Oftung F, et al. A nasal whole-cell pertussis vaccine induces specific systemic and cross-reactive mucosal antibody responses in human volunteers. *J Med Microbiol*. 2000;49(2):157-63.

Berstad AK, Oftung F, Korsvold GE, Haugen IL, Froholm LO, Holst J, et al. Induction of antigen-specific T cell responses in human volunteers after intranasal immunization with a whole-cell pertussis vaccine. *Vaccine*. 2000;18(22):2323-30.

Brandileone MC, Andrade AL, Teles EM, Zanella RC, Yara TI, Di Fabio JL, et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. *Vaccine*. 2004;22(29-30):3890-6.

---

\*De acordo com:  
international Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from:  
[http://nml.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://nml.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL, Guerra ML, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. *J Infect Dis.* 2003;187(8):1206-12.

Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1694-701.

Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* 2007;3(11):e168.

Brynjolfsson SF, Bjarnarson SP, Mori E, Del Giudice G, Jonsdottir I. Concomitant administration of *Mycobacterium bovis* BCG with the meningococcal C conjugate vaccine to neonatal mice enhances antibody response and protective efficacy. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(11):1936-42.

Carbonetti NH. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 2010;5(3):455-69.

Carniel EF, Morcillo AM, Blotta MH, Da Silva MT, Mazzola TN, Antonio MA, et al. Immunogenicity and safety of combined intradermal recombinant Hepatitis B with BCG vaccines at birth. *Vaccine.* 2008;26(5):647-52.

Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science.* 2011;331(6016):430-4.

Dagan R. New insights on pneumococcal disease: what we have learned over the past decade. *Vaccine.* 2009;27 Suppl 3:C3-5.

Dagan R, Goldblatt D, Maleckar JR, Yaich M, Eskola J. Reduction of antibody response to an 11-valent pneumococcal vaccine coadministered with a vaccine containing acellular pertussis components. *Infect Immun.* 2004;72(9):5383-91.

Darrieux M, Moreno AT, Ferreira DM, Pimenta FC, de Andrade AL, Lopes AP, et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 3):273-8.

de OMAP, Campos LC, dos Santos MS, Azevedo J, Dos Santos RC, Carvalho Mda G, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine.* 2011;29(6):1139-44.

Dirix V, Mielcarek N, Debrue AS, Willery E, Alonso S, Versheure V, et al. Human dendritic cell maturation and cytokine secretion upon stimulation with Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. *Microbes Infect.* 2014;16(7):562-70.

Dos Santos SR, Passadore LF, Takagi EH, Fujii CM, Yoshioka CR, Gilio AE, et al. Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. *Vaccine.* 2013.

Falup-Pecurariu O. Lessons learnt after the introduction of the seven valent-pneumococcal conjugate vaccine toward broader spectrum conjugate vaccines. *Biomed J.* 2012;35(6):450-6.

Ferreira DM, Darrieux M, Oliveira ML, Leite LC, Miyaji EN. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(3):499-505.

Ferreira DM, Darrieux M, Silva DA, Leite LC, Ferreira JM, Jr., Ho PL, et al. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(5):636-45.

Ferreira DM, Oliveira ML, Moreno AT, Ho PL, Briles DE, Miyaji EN. Protection against nasal colonization with Streptococcus pneumoniae by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). *Microb Pathog.* 2010;48(6):205-13.

Ferreira PC, Campos IB, Abe CM, Trabulsi LR, Elias WP, Ho PL, et al. Immunization of mice with Lactobacillus casei expressing intimin fragments produces antibodies able to inhibit the adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to cultivated epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;54(2):245-54.

Fowler S, Xing DK, Bolgiano B, Yuen CT, Corbel MJ. Modifications of the catalytic and binding subunits of pertussis toxin by formaldehyde: effects on toxicity and immunogenicity. *Vaccine.* 2003;21(19-20):2329-37.

Franco CM, Andrade AL, Andrade JG, Almeida e Silva S, Oliveira CR, Pimenta FC, et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal Streptococcus pneumoniae isolates in children attending day-care centers in Brazil. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(1):77-9.

Hanniffy SB, Carter AT, Hitchin E, Wells JM. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using Lactococcus lactis affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis.* 2007;195(2):185-93.

Haughney SL, Petersen LK, Schoofs AD, Ramer-Tait AE, King JD, Briles DE, et al. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. *Acta Biomater.* 2013;9(9):8262-71.

Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol*. 2006;177(11):7980-9.

Hollingshead SK, Baril L, Ferro S, King J, Coan P, Briles DE. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 2):215-21.

Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000;68(10):5889-900.

Holmgren J, Adamsson J, Anjuere F, Clemens J, Czerkinsky C, Eriksson K, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett*. 2005;97(2):181-8.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288-301.

Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R, 3rd. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect Immun*. 2002;70(4):1739-49.

Kim SH, Song JH, Chung DR, Thamlikitkul V, Yang Y, Wang H, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1418-26.

Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. *Rev Infect Dis*. 1981;3(2):246-53.

Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, et al. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2013;81(5):1625-34.

Lambert-Buisine C, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F. N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol*. 1998;28(6):1283-93.

Langermann S, Palaszynski SR, Burlein JE, Koenig S, Hanson MS, Briles DE, et al. Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med*. 1994;180(6):2277-86.

Leusch MS, Paulaitis S, Friedman RL. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: production, purification, and partial characterization. *Infect Immun*. 1990;58(11):3621-6.

Li Y, Wang S, Scarpellini G, Gunn B, Xin W, Wanda SY, et al. Evaluation of new generation *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(2):593-8.

Lima FA, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Palma GM, Ferreira JM, Jr., et al. Controlled Inflammatory Responses in the Lungs Are Associated with Protection Elicited by a Pneumococcal Surface Protein A-Based Vaccine against a Lethal Respiratory Challenge with *Streptococcus pneumoniae* in Mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(9):1382-92.

Lima FA, Miyaji EN, Quintilio W, Raw I, Ho PL, Oliveira ML. Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. *Vaccine*. 2013;31(20):2465-70.

Lobet Y, Feron C, Dequesne G, Simoen E, Hauser P, Loch C. Site-specific alterations in the B oligomer that affect receptor-binding activities and mitogenicity of pertussis toxin. *J Exp Med*. 1993;177(1):79-87.

Locht C. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes Infect*. 2008;10(9):1051-6.

Locht C, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J*. 2011;278(23):4668-82.

Locht C, Mielcarek N. New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(2):121-33.

Macdonald-Fyall J, Xing D, Corbel M, Baillie S, Parton R, Coote J. Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* towards co-administered antigens. *Vaccine*. 2004;22(31-32):4270-81.

Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect Immun*. 1996;64(12):5295-301.

Mangmool S, Kurose H. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)*. 2011;3(7):884-99.

McDaniel LS, Ralph BA, McDaniel DO, Briles DE. Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. *Microb Pathog*. 1994;17(5):323-37.

McGuirk P, Mills KH. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1- or Th2-inducing pertussis vaccines. *Infect Immun.* 2000;68(3):1383-90.

Meade BD, Plotkin SA, Locht C. Possible options for new pertussis vaccines. *J Infect Dis.* 2014;209 Suppl 1:S24-7.

Melvin JA, Scheller EV, Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(4):274-88.

Menozzi FD, Mutombo R, Renauld G, Gantiez C, Hannah JH, Leininger E, et al. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994;62(3):769-78.

Miyaji EN, Oliveira ML, Carvalho E, Ho PL. Serotype-independent pneumococcal vaccines. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(18):3303-26.

Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(3):439-46.

Moyo SJ, Steinbakk M, Aboud S, Mkopi N, Kasubi M, Blomberg B, et al. Penicillin resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal carrier children under 5 years of age in Dar es Salaam, Tanzania. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 7):952-9.

Mukerji R, Mirza S, Roche AM, Widener RW, Crony CM, Rhee DK, et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. *J Immunol.* 2012;189(11):5327-35.

Murphey C, Chang S, Zhang X, Arulanandam B, Forsthuber TG. Induction of polyclonal CD8+ T cell activation and effector function by Pertussis toxin. *Cell Immunol.* 2011;267(1):50-5.

Nabors GS, Braun PA, Herrmann DJ, Heise ML, Pyle DJ, Gravenstein S, et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine.* 2000;18(17):1743-54.

Nahrevanian H, Jafary SP, Nemati S, Farahmand M, Omidinia E. Evaluation of anti-leishmanial effects of killed *Leishmania* vaccine with BCG adjuvant in BALB/c mice infected with *Leishmania major* MRHO/IR/75/ER. *Folia Parasitol (Praha).* 2013;60(1):1-6.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):893-902.

Oh H, Kim BG, Nam KT, Hong SH, Ahn DH, Choi GS, et al. Characterization of the carbohydrate binding and ADP-ribosyltransferase activities of chemically detoxified pertussis toxins. *Vaccine*. 2013;31(29):2988-2993.

Oliveira ML, Miyaji EN, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Lima FA, et al. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. *PLoS One*. 2010;5(5):e10863.

Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, Ishii KJ, et al. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine*. 2009;27(24):3181-8.

Orr B, Douce G, Baillie S, Parton R, Coote J. Adjuvant effects of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* after intranasal immunisation of mice. *Vaccine*. 2007;25(1):64-71.

Pimenta FC, Ribeiro-Dias F, Brandileone MC, Miyaji EN, Leite LC, Sgambatti de Andrade AL. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2838-43.

Potter CW, Tamizifar H, Jennings R. Immune response of mice to immunization with subunit influenza A vaccine in DTP vaccine. *Vaccine*. 1995;13(3):253-60.

Poulain-Godefroy O, Menozzi FD, Alonso S, Vendeville C, Capron A, Loch C, et al. Adjuvant activity of free *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin delivered by mucosal routes. *Scand J Immunol*. 2003;58(5):503-10.

Poulain-Godefroy O, Mielcarek N, Ivanoff N, Remoue F, Schacht AM, Phillips N, et al. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin enhances the immunogenicity of liposome-delivered antigen administered intranasally. *Infect Immun*. 1998;66(4):1764-7.

Pourahmadi A, Esmaili, F., Hosseini, Z., Rezaee, A., Akhavizadegan, M., Mirjalili, A. Proliferate response to purified *Bordetella pertussis* toxin on murine spleen lymphocytes. *Arch. Razi Ins*. 2004;58:8.

Prikazsky V, Bock HL. Higher anti-hepatitis B response with combined DTPw-HBV vaccine compared with separate administration in healthy infants at 3, 4 and 5 months of age in Slovakia. *Int J Clin Pract*. 2001;55(3):156-61.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(8):1103-9.

Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009;30(1):23-32.

Ren B, Li J, Genschmer K, Hollingshead SK, Briles DE. The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(10):1574-82.

Ren B, McCrory MA, Pass C, Bullard DC, Ballantyne CM, Xu Y, et al. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol.* 2004;173(12):7506-12.

Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun.* 2004;72(1):114-22.

Roberts M, Bacon A, Rappuoli R, Pizza M, Cropley I, Douce G, et al. A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT-9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins. *Infect Immun.* 1995;63(6):2100-8.

Ryan M, McCarthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KH. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol.* 1998;10(5):651-62.

Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Jr., Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun.* 2004;72(9):5031-40.

Stainer DWS, M. J. A simple chemically defined médium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *Journal of General Microbiology.* 1971;63:211-220.

Tai SS. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit Rev Microbiol.* 2006;32(3):139-53.

Tamizifar H, Jennings R, Ali SA, Potter CW. Induction of IL-2 and IFN-gamma in BALB/c mice immunised with subunit influenza A vaccine in combination with whole cell or acellular DTP vaccine. *J Med Microbiol.* 1997;46(1):61-6.

Tart RC, McDaniel LS, Ralph BA, Briles DE. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J Infect Dis.* 1996;173(2):380-6.

Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1999;67(9):4720-4.

Vela Coral MC, Fonseca N, Castaneda E, Di Fabio JL, Hollingshead JK, Briles DE. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis*. . 2001;7(5):832-6.

Wang ZY, Yang D, Chen Q, Leifer CA, Segal DM, Su SB, et al. Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways. *Exp Hematol*. 2006;34(8):1115-24.

Webster J, Theodoratou E, Nair H, Seong AC, Zgaga L, Huda T, et al. An evaluation of emerging vaccines for childhood pneumococcal pneumonia. *BMC Public Health*. 2011;11 Suppl 3:S26.

Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. 2011;378(9807):1962-73.

Weiser JN. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(2):97-102.

Xin W, Li Y, Mo H, Roland KL, Curtiss R, 3rd. PspA family fusion proteins delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium extend and enhance protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2009;77(10):4518-28.

Yother J, Briles DE. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. *J Bacteriol*. 1992;174(2):601-9.

Zorzeto TQ, Higashi HG, da Silva MT, Carniel Ede F, Dias WO, Ramalho VD, et al. Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(4):544-50.