TASSON DA COSTA RODRIGUES

Imunização pulmonar com nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2018

TASSON DA COSTA RODRIGUES

Imunização pulmonar com nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr^a. Eliane Namie Miyaji

Versão Original.

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Costa Rodrigues, Tasson
Imunização pulmonar com nanopartículas contendo o
antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) /
Tasson da Costa Rodrigues; orientadora Eliane Namie
Miyaji. -- São Paulo, 2018.
85 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Streptococcus pneumoniae. 2. Pneumonia. 3.
PspA. 4. Vacinas pulmonares. 5. Nanopartículas. I.
Namie Miyaji, Eliane, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Tasson da Costa Rodrigues

Título da Dissertação: Imunização pulmonar com nanopartículas contendo o antígeno PspA
(Pneumococcal surface protein A)

Orientadora: Dr^a. Eliane Namie Miyaji

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação, em sessão pública realizada no
dia ____/____/____, considerou

() **Aprovado**

() **Reprovado**

Examinador: Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinador: Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinador: 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 "Nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) como vacina contra pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae*", protocolo nº 1160/13, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji - 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 13/11/2013.

This is to certify that the proposal Nanoparticles containing PspA (Pneumococcal surface protein A) as a vaccine against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, protocol nº 1160/13, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji, - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/13/2013. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
01/2014 - 12/2018 Centro de Biotecnologia	344 camundongos Balb/c 5-7sem - 18-22g (F)

São Paulo, 18 de novembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

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 "Nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) como vacina contra pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae*", protocolo nº 1160/13, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/11/2014.

This is to certify that the proposal "Nanoparticles containing PspA (Pneumococcal surface protein A) as a vaccine against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*", protocol nº 1160/13, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/19/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 01/2014 - 12/2018	Nº de animais/espécie	Observação
Centro de Biotecnologia	6 Camundongos C57BL/6 5-7sem (F)	Aditivo de animais

São Paulo, 21 de novembro de 2014

Dra. Wafa H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) como vacina contra pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae*", **protocolo nº 1160/13**, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji e Tasson da Costa Rodrigues – 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 17/6/2015.

This is to certify that the proposal "Nanoparticles containing PspA (Pneumococcal surface protein A) as a vaccine against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*", **protocol nº 1160/13**, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji and Tasson da Costa Rodrigues – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/17/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
01/2014 - 12/2018 Centro de Biotecnologia	Sem adição de animais	Inclusão de interessado

São Paulo, 22 de junho de 2015

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) como vacina contra pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae*", protocolo nº 1160/13, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji e Tasson da Costa Rodrigues – 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 20/4/2016.

This is to certify that the proposal "Nanoparticles containing PspA (Pneumococcal surface protein A) as a vaccine against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*", protocol nº 1160/13, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji and Tasson da Costa Rodrigues – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 4/20/2016. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
01/2014 - 12/2018 Centro de Biotecnologia	25 Camundongos C57Bl/6 10 a 12 sem (F); 55 Camundongos Balb/c 10 a 12 sem (F)	Aditivo de animais

São Paulo, 25 de abril de 2016

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Nanopartículas contendo o antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) como vacina contra pneumonia causada por *Streptococcus pneumoniae*", **protocolo nº 1160/13**, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji e Tasson da Costa Rodrigues – 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 22/3/2017.

This is to certify that the proposal "Nanoparticles containing PspA (Pneumococcal surface protein A) as a vaccine against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*", **protocol nº 1160/13**, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji and Tasson da Costa Rodrigues – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 3/22/2017. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
01/2014 - 12/2020 Centro de Biotecnologia	160 Camundongos Balb/c 5 a 8 sem (F) - adquiridos do Biotério da Faculdade de Medicina da USP	Prorrogação de vigência Aditivo de animais

São Paulo, 24 de março de 2017

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

Dedico à minha avó
Idalice, que estará sempre
nas minhas lembranças.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem se dedicado e me dado a oportunidade de chegar até aqui. Em especial à minha mãe que sempre se fez presente e sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos.

À minha tia Nice que abriu as portas da sua casa para me receber e acolher até os dias de hoje. E a todos os meus parentes que sempre me apoiaram e me deram suporte no passado e ainda hoje, em especial à Isai.

À Eliane que me recebeu no laboratório e acreditou em mim, me ajudou muito em todos os experimentos e sempre me incentivou. Palavras são insuficientes para demonstrar minha gratidão.

À Prof^a. Ana Paula por ter me indicado e me dado uma oportunidade de crescimento profissional, e a todos os professores que passaram por minha vida que de alguma forma contribuíram para a construção do meu ser.

À Dr^a Viviane e Douglas do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), ao Dr. Imran da Liverpool John Moores University (Liverpool, UK), Dr. Nitesh da University of New Mexico (Albuquerque, USA) e à Dr^a. Daniela do Liverpool School of Tropical Medicine (Liverpool, UK) pelos trabalhos desenvolvidos que fundamentaram este projeto.

À todas as pessoas do laboratório que ajudaram mesmo que indiretamente. Às técnicas Vera Lucia, Nídia e Aline pela solicitude e pró-atividade. Aos pesquisadores Maria Leonor, Alessandra, Enéas e Josefa por todos os conselhos, ajudas e ensinamentos. Às antigas alunas que sempre farão falta, Rafaella e Rubia. À Stefanni por todas as ajudas, pela paciência e disponibilidade. À Júlia por preencher a sala com toda a sua alegria e por todos os convites para o bar. À Fabiana e Paloma pelo companheirismo.

À Fábia, Eliane, Vânia e à todos da secretaria do programa por todas as ajudas e resoluções de dúvidas. Obrigado por facilitar todo este processo.

Aos amigos da faculdade que carrego até hoje e possuo um carinho especial, Daniele, Sarah, Ana Paula, Hugo, Filipe, Ana Carolina, Nataska, Luciana, Viviane, Miriã e Monique. Em especial, agradeço ao Cassio, por uma amizade duradoura e pelo companheirismo. Ao amigo

Ivo, que independente do tempo que fiquemos separados, sempre que nos encontramos parece que nos vimos no dia anterior.

Às agencias financiadoras de pesquisa FAPESP, CAPES e CNPq, que fomentaram este projeto de alguma forma.

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota ”. (Theodore Roosevelt)

RESUMO

Streptococcus pneumoniae, ou pneumococo, é um constituinte da microbiota humana, mas em alguns casos pode causar doenças, como pneumonia, bacteremia e meningite. Uma das principais formas de conter as infecções pneumocócicas foi o desenvolvimento de vacinas baseadas na indução de anticorpos contra o polissacarídeo capsular (PS). Como as vacinas pneumocócicas conjugadas (PCVs) possuem um número limitado de PSs e sua efetividade contra doenças não-invasivas ainda é controversa, o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas que não sejam sorotipo-específicas continua sendo uma prioridade. *Pneumococcal surface protein A* (PspA) é um antígeno com grande potencial para uso em vacinas contra pneumococo. PspA apresenta certa variabilidade entre isolados e é dividida em família 1 (clados 1 e 2), família 2 (clados 3, 4 e 5) e família 3 (clado 6). O objetivo deste trabalho é avaliar a imunogenicidade e eficácia de nanopartículas (NPs) compostas do polímero poli(glicerol-adipato-co- ω -pentadecalactona) (PGA-co-PDL) contendo o antígeno PspA (PspA4Pro) e formuladas em partículas micrométricas (NP/NCMP PspA4Pro) em modelo murino de imunização pulmonar. Inicialmente, foram testadas três técnicas de inoculação para imunização pulmonar de camundongos. Tanto a utilização de um insuflador pulmonar para inoculação das NP/NCMPs sob a forma de pó quanto o uso de um *microsprayer* para inoculação das NP/NCMPs após ressuspensão em salina não foram capazes de induzir uma resposta de indução de IgG sérico de forma homogênea. Na terceira estratégia de imunização foi utilizada uma micropipeta para a imunização através de instilação por via nasal de duas doses da ressuspensão das NP/NCMPs. A imunização com NP/NCMP PspA4Pro através dessa técnica mostrou-se adequada, com a indução de IgG anti-PspA4 Pro no soro e no lavado broncoalveolar (BALF). Anticorpos IgG induzidos pela imunização com NP/NCMP PspA4Pro mostraram ligação à superfície de bactérias intactas expressando PspA dos clados 3, 4 e 5 (família 2), mas não foi observada ligação a bactérias expressando PspA dos clados 1 e 2 (família 1). Camundongos imunizados foram então desafiados com as linhagens

ATCC6303 (sorotipo 3, PspA de clado 5) ou EF3030 (sorotipo 19F, PspA de clado 1) e o BALF foi coletado após 12 e 24 horas, respectivamente. Foi observada uma redução da carga bacteriana no BALF após desafio com a linhagem ATCC6303, além de uma redução na concentração de IL-6, TNF- α , KC/CXCL1 e MIP-2/CXCL2 em camundongos imunizados com NP/NCMP PspA4Pro. Todavia, esta redução da carga bacteriana no BALF não foi observada após desafio com a linhagem EF3030. Foi realizado ainda um desafio para avaliar a sobrevivência final após desafio com a linhagem ATCC6303 e foi observado que a imunização com NP/NCMP PspA4Pro foi capaz de induzir proteção parcial. A imunização pulmonar NP/NCMP PspA4Pro foi, portanto, capaz de induzir anticorpos no soro e pulmões dos camundongos, conferindo proteção contra uma linhagem de pneumococo expressando PspA da mesma família. Deste modo, estudos futuros são necessários para garantir maior proteção vacinal.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Pneumonia. PspA. Vacinas pulmonares. Nanopartículas.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae, or pneumococcus, is part of the human microbiota, but in some cases it can cause diseases, such as pneumonia, bacteremia and meningitis. One of the main forms of controlling pneumococcal infections was the development of vaccines based on the induction of antibodies against capsular polysaccharide (PS). Since a limited number of serotypes are included in pneumococcal conjugate vaccines (PCVs) and their effectiveness against non-invasive diseases is still controversial, the development of a new generation of serotype-independent vaccines is still a priority. Pneumococcal surface protein A (PspA) is an antigen with great potential for vaccine use. PspA shows some variability between strains and is divided in family 1 (clades 1 and 2), family 2 (clades 3, 4 and 5) and family 3 (clade 6). The aim of this work is to evaluate the immunogenicity and efficacy of poly (glycerol-adipate-co- ω -pentadecalactone) (PGA-co-PDL) nanoparticles (NPs) containing PspA (PspA4Pro) and formulated in micrometric particles (NP/NCMP PspA4Pro) in a murine model of pulmonary immunization. Initially, three inoculation techniques were tested for lung immunization of mice. Both the inoculation of the NP/NCMPs as dry powder using a pulmonary insufflator and inoculation of the resuspension of the NP/NCMPs in saline using a microsyringe did not induce IgG serum antibodies reproducibly. For the third immunization strategy, a micropipette was used for immunization through nasal instillation of two doses of the resuspension of the NP/NCMPs. Immunization with NP/NCMP PspA4Pro using this technique showed reproducible results, with the induction of anti-PspA4Pro IgG in serum and bronchoalveolar lavage (BALF). IgG antibodies induced by immunization with NP/NCMP PspA4Pro showed binding to the surface of intact bacteria expressing PspA from clades 3, 4 and 5 (family 2), but no binding was observed for bacteria expressing PspA from clades 1 and 2 (family 1). Immunized mice were then challenged with strains ATCC6303 (serotype 3, PspA clade 5) or EF3030 (serotype 19F, PspA1) and BALF was collected after 12 and 24 hours, respectively. A reduction in bacterial load in BALF was observed in mice challenged with ATCC6303. A reduction in IL-6, TNF- α , KC/CXCL1 and MIP-2 CXCL2 levels in BALF of mice immunized with NP/NCMP PspA4Pro was also observed. Reduction in bacterial load was not observed for mice challenged with strain EF3030 though. A challenge with strain ATCC6303 strain was also performed to evaluate overall survival and partial protection was observed for the group immunized with NP/NCMP PspA4Pro. In conclusion, lung immunization with NP/NCMP PspA4Pro is able to induce antibodies in serum and lungs,

conferring protection against a pneumococcal strain expressing PspA from the same family. Future studies are thus necessary to guarantee broader vaccine protection.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Pneumonia. PspA. Pulmonary vaccines. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características do pneumococo. _____	20
Figura 2 - Fatores de virulência do <i>Streptococcus pneumoniae</i> . _____	21
Figura 3 - Interação comensal e patogênica de <i>S. pneumoniae</i> e hospedeiro. _____	22
Figura 4 - Estrutura da PspA. _____	28
Figura 5 - Nanopartículas de PGA-co-PDL adsorvidas com PspA4Pro. _____	36
Figura 6 - Insuflador pulmonar. _____	37
Figura 7 - <i>Microsprayer</i> . _____	38
Figura 8 - Esquema resumido de atividades para imunização com a micropipeta. _____	38
Figura 9 - Título de anticorpos séricos em animais imunizados com insuflador pulmonar. _	43
Figura 10 - Título de anticorpos séricos em animais imunizados com <i>microsprayer</i> . _____	44
Figura 11 - Distribuição pulmonar após instilação de corante <i>Evans Blue</i> . _____	45
Figura 12 - Título de anticorpos séricos em animais imunizados através de instilação com micropipeta. _____	46
Figura 13 - Avaliação da indução de subclasses de IgG no soro dos animais. _____	46
Figura 14 - Ligação de IgG sérico à superfície de pneumococos intactos. _____	47
Figura 15 - Detecção de anticorpos no BALF de animais imunizados através de instilação com micropipeta. _____	48
Figura 16 - UFC total no BALF de animais imunizados e desafiados com a linhagem ATCC6303. _____	48
Figura 17 - Concentração de citocinas/quimiocinas no BALF dos animais 12 horas após desafio. _____	49
Figura 18 - Imunofenotipagem das células presentes no BALF 12 horas após desafio. _____	50
Figura 19 - Curva de sobrevivência de animais desafiados com a linhagem ATCC6303. _	51
Figura 20 - UFC total no BALF de animais imunizados e desafiados com linhagem EF3030. _____	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sobrevivência de camundongos após desafio com o isolado ATCC6303,____51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Macrófagos alveolares
ANOVA	Análise de variância simples
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BALF	Lavado broncoalveolar
BSA	Albumina sérica bovina
CAP	Pneumonia adquirida na comunidade
CBR	Região de ligação à colina
CDR	Região definidora de clado
CHP	Pululan carregando grupo colesteril
cCHP	Pululan carregando grupo colesteril catiônico
CFSE	Ester de N-succinimidil-diacetato 5(6)-carboxifluoresceína
CRM ₁₉₇	Proteína variante e não tóxica da toxina diftérica
DC	Célula dendrítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Imunoensaio com anticorpo conjugado a enzima
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Intérferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2a	Imunoglobulina G subclasse 2a
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17 subtipo A
IPD	Doenças pneumocócicas invasivas
KC/CXCL1	Quimiocina derivada de queratinócito/ Quimiocina ligante do tipo 1 com motivo C-X-C
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LytA	Autolisina A
MAb	Anticorpo monoclonal
MCP-1/CCL-2	Proteína quimiotática 1 de monócito/ Quimiocina ligante 2 com motivo C-C
MIP-2/CXCL2	Proteína inflamatória de macrófago do tipo 2/ Quimiocina ligante do tipo 2 com motivo C-X-C
MPLA	Monofosforil lipídeo A
MS	Ministério da Saúde
NanA	Neuraminidase A
NCMP	Micropartícula nanocomposta
NP	Nanopartícula
NP/NCMP PspA4Pro	Micropartícula composta por nanopartículas adsorvidas com PspA4Pro
NVT	Sorotipos não-vacinais
DO	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofenildiamina
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino com adição de Tween 20 a 0,05%
PBS/BSA 1%	Tampão fosfato-salino com adição de Albumina sérica bovina a 1%
PCV	Vacina pneumocócica conjugada a proteínas
PCV-7	Vacina pneumocócica conjugada 7-valente
PCV-10	Vacina pneumocócica conjugada 10-valente

PCV-13	Vacina pneumocócica conjugada 13-valente
PEI	Polietilenoimina
PGA-co-PDL	Poli(glicerol-adipato-co- ω -pentadecalactona)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA	Poli D,L-lactídeo
PLGA	Poli-D,L-láctico-co-glicólico
Ply	Pneumolisina
PNI	Programa Nacional de Imunização
pNPP	p-Nitrofenil fosfatase
PPV	Vacina pneumocócica polissacarídica
PPV23	Vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente
PS	Polissacarídeo
PsaA	Antígeno A de superfície de pneumococo
PspA	Proteína A de superfície de pneumococo
PspA4	Proteína A de superfície de pneumococo do clado 4
PspA5	Proteína A de superfície de pneumococo do clado 5
PspA4Pro	Proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 com primeira parte da região rica em prolina
PspC	Proteína C de superfície de pneumococo
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPF	Livre de patógenos específicos, do inglês <i>specific pathogen free</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
TGI	Trato gastrointestinal
VT	Sorotipos vacinais
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 O PNEUMOCOCCO	20
1.2 FISIOPATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS	22
1.3 VACINAS PNEUMOCÓCICAS	24
1.4 PRÓXIMA GERAÇÃO DE VACINAS E ANTÍGENOS PROTEICOS	27
1.4.1 PspA COMO ANTÍGENO VACINAL	28
1.5 VACINAS PULMONARES	30
1.6 POLÍMEROS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE NPs	31
1.7 NPs DE PGA-co-PDL CONTENDO PspA COMO MODELO DE VACINA PULMONAR	34
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 FORMULAÇÕES VACINAIS	36
3.2 LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	36
3.3 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS	37
3.3.1 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM INSUFLADOR PULMONAR	37
3.3.2 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM <i>MICROSPRAYER</i>	37
3.3.3 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM MICROPIPETA	38
3.3.4 OBTENÇÃO DE SORO E BALF	39
3.3.5 DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS NO SORO E BALF	39
3.3.6 LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS DO SORO À SUPERFÍCIE INTACTA DE BACTÉRIAS DE DIFERENTES LINHAGENS	40
3.3.7 DESAFIO INTRANASAL	40
3.3.8 DETECÇÃO DE CITOCINAS NO BALF E IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS	41
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 RESULTADOS	43
4.1 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DO INSUFLADOR PULMONAR	43
4.2 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM O <i>MICROSPRAYER</i>	44
4.3 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DE INSTILAÇÃO UTILIZANDO MICROPIPETA	45

5 DISCUSSÃO	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 O PNEUMOCOCO

Streptococcus pneumoniae, comumente conhecido como pneumococo, é uma espécie bacteriana com importância histórica. Ela foi utilizada em 1944 por Avery, MacLeod e McCarty para comprovar que o DNA é a molécula responsável pela hereditariedade, até então associada às proteínas, ao transformar uma cepa não encapsulada de pneumococo em outra cepa virulenta encapsulada (AVERY et al., 1944; TETTELIN et al., 2001).

O pneumococo é uma bactéria Gram-positiva que se apresenta em diplococos ou em cadeias curtas. São bactérias anaeróbias facultativas e produzem a maior parte da energia através da fermentação da glicose. Possuem cápsula polissacarídica densa, que confere um aspecto mucóide às colônias cultivadas em ágar-sangue (Figura 1) e é um importante mecanismo da bactéria de escape à fagocitose pelas células do hospedeiro.

Figura 1 - Características do pneumococo.

Bactéria em meio sólido apresenta um crescimento com colônias mucoides e um halo esverdeado devido à hemólise parcial das hemácias presente no ágar (A). Em um aumento de 1000x, é possível ver bactérias agrupadas em diplococos (setas) e ao centro, neutrófilos digerindo as bactérias.

Fonte: A - Arquivo pessoal; B - VAN DER POLL et al. (2009)

Através dos polissacarídeos capsulares (PS) é possível fazer uma diferenciação desta bactéria em sorotipos. A classificação em sorotipos é feita pelo reconhecimento por anticorpos específicos, dividindo-as nos mais de 90 sorotipos que são descritos atualmente. Técnicas mais recentes permitem ainda fazer a distinção química dos PS e ainda fazer uma diferenciação gênica entre os isolados de pneumococo (BROOKS et al., 1998; GENO et al., 2015; RAMIREZ et al., 2015). Desde 2001 esta bactéria recebeu uma maior atenção devido à publicação do primeiro sequenciamento genômico. Trabalhos posteriores envolvendo o

sequenciamento de um grande número de isolados mostraram que o pneumococo possui uma grande variabilidade gênica. As regiões com maior nível de recombinação são os *loci* contendo genes de resistência a antibióticos e genes envolvidos na síntese de PS, tornando esta bactéria altamente adaptável (CROUCHER et al., 2011; HSIEH et al., 2013; TETTELIN et al., 2015). A troca gênica entre espécies relacionadas fornece ainda um importante mecanismo de evolução do pneumococo (DONATI et al., 2010).

Na figura 2 é possível ver que existem muitos outros fatores de virulência nesta bactéria além do PS, incluindo as proteínas pneumolisina (Ply), autolisina (LytA), neuraminidase A (NanA), antígeno A de superfície de pneumococo (PsaA), *pili*, proteína C de superfície de pneumococo (PspC) e a proteína A de superfície de pneumococo (PspA) (OGUNNIYI et al., 2015).

O pneumococo é descrito como um componente da microbiota das vias aéreas superiores e normalmente o hospedeiro é colonizado assintomaticamente (BROOKS et al., 1998). Entretanto, a relação entre patógeno-hospedeiro é muito complexa, sendo esta bactéria comumente descrita como causa de doenças com alta morbidade e mortalidade, como otite média, pneumonia, meningite e sepse em crianças (O'BRIEN et al., 2009).

1.2 FISIOPATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS

A infecção pelo *S. pneumoniae* inicia-se na colonização da nasofaringe. O organismo humano possui barreiras iniciais, como o muco, para impedir a adesão e proliferação da bactéria na mucosa (COONROD et al., 1991; NELSON et al., 2007). Entretanto, o pneumococo possui mecanismos de escape a estas barreiras iniciais. O muco pode ser degradado por enzimas liberadas pelo pneumococo, quebrando os glicoconjugados, e é repelido pela cápsula, carregada negativamente (NELSON et al., 2007; BURNAUGH et al., 2008). A Ply, também liberada pela bactéria, provavelmente após lise, age diminuindo o batimento ciliar das células epiteliais ajudando o pneumococo a fixar-se na mucosa (FELDMAN et al., 1990; FELDMAN et al., 2002). O *pilus* é outro fator que auxilia na adesão do pneumococo ao epitélio da nasofaringe e favorece o desenvolvimento de doença invasiva (BAROCCHI et al., 2006). Na Figura 3, é possível ver as relações comensais e patogênicas do pneumococo com humanos.

Figura 3 - Interação comensal e patogênica de *S. pneumoniae* e hospedeiro.

A relação com o hospedeiro pode ser assintomática, o que ocorre várias vezes ao longo da vida. Entretanto, a bactéria pode chegar a sítios estéreis da mucosa, como pulmões e ouvido médio, gerando uma maior resposta inflamatória. Quando a infecção não é controlada, o pneumococo pode avançar para a corrente sanguínea e outros tecidos, gerando uma condição mais severa.

Fonte: MIYAJI et al. (2013)

Para o desenvolvimento da doença, o pneumococo necessita driblar também o sistema imune inato do hospedeiro. Para isso, esta bactéria possui vários mecanismos de escape (MOOK-KANAMORI et al., 2011). A cápsula protege a bactéria contra a deposição de moléculas do sistema complemento e IgA. Além disso, a IgA protease do pneumococo

também age clivando qualquer molécula de IgA1 que tenha se depositado na superfície da bactéria, impedindo a ação opsonizante deste anticorpo (WEISER et al., 2003; FASCHING et al., 2007; SABHARWAL et al., 2009). A PspA age tanto na fase de colonização, impedindo uma ação bactericida da apolactoferrina (SHAPER et al., 2004), como durante a invasão, evitando a deposição do C3 da cascata da via clássica do complemento e evitando a ativação da via alternativa do complemento por impedir a formação da C3 convertase (TU et al., 1999; REN et al., 2004; SHAPER et al., 2004). A PspC é capaz de aderir à fração C3b do sistema complemento e ainda ligar-se à fração C4b e bloquear a via clássica. Esta proteína pode também se ligar ao fator H, um componente regulatório do sistema complemento, e bloquear as vias alternativa e da lectina do complemento (DAVE et al., 2001; DIEUDONNE-VATRAN et al., 2009; YUSTE et al., 2010).

As doenças pneumocócicas invasivas (IPD) geralmente ocorrem em pessoas no extremo de idades, ou seja, em crianças menores de 2 anos e idosos. Entretanto, alguns fatores podem contribuir ainda mais com o desenvolvimento de IPD, como a presença de comorbidades (Diabetes Mellitus, doenças crônicas de fígado ou rim, etilismo), talassemia major, má nutrição, esplenectomia, hipogamaglobulinemia, síndrome de Wiskott-Aldrich (imunodeficiência recessiva ligada ao cromossomo X que afeta linfócitos T e B, caracterizada por hemorragias e infecções), fratura de crânio com vazamento de líquido cefalorraquidiano, uso de drogas imunossupressoras, infecção pelo HIV, alergias e o hábito de fumar. A infecção prévia com o vírus influenza também mostrou ser um fator muito associado ao desenvolvimento de IPD (MOOK-KANAMORI et al., 2011). Alguns fatores das bactérias podem influenciar no desfecho da doença, pois os sorotipos 1, 7F e 8 possuem baixo risco de causar morte, enquanto que os sorotipos 3, 6A, 6B, 9N, 19F apresentam um elevado risco de morte devido à invasão de tecidos (DOCKRELL et al., 2012).

O pneumococo já era considerado um dos quatro agentes infecciosos que mais matam no mundo há muito tempo. No ano 2000, um estudo estimou a ocorrência de 14,5 milhões de doenças pneumocócicas severas, ocasionando cerca de 826.000 mortes de crianças entre 1 e 59 meses, principalmente em países da África e Ásia. A maior parte destas mortes ocorrem em crianças menores de 2 anos de países de baixa renda. Esta bactéria é a principal causa de pneumonia adquirida na comunidade (CAP) e meningite em adultos, principal causa de otite média e a terceira causa mais comum de meningite em crianças (BRUYN et al., 1991; BAROCCHI et al., 2006; WHO, 2007; O'BRIEN et al., 2009). Em 2017, o pneumococo estava presente numa lista divulgada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que

elencava espécies de bactérias para as quais deveria ser dada prioridade em investimentos para pesquisas em desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017).

A pneumonia é a principal doença infecciosa causadora de morte em crianças em todo o mundo, responsável por 16% de todas as causas de morte nesta faixa etária no ano de 2015. Em números absolutos, ela foi responsável por matar mais de 920 mil crianças menores de 5 anos de idade. Dentre as causas de pneumonias, o *S. pneumoniae* é o principal agente infeccioso (WHO, 2016). Nos Estados Unidos e Europa, o pneumococo é responsável por 30 a 50% das CAP com necessidade de internação, inclusive de adultos. Nos Estados Unidos, foi estimada a ocorrência anual, entre as pessoas com mais de 50 anos, de 29.500 casos de IPD, mais de 502 mil casos de pneumonias pneumocócicas não bacterêmicas e mais de 25 mil mortes relacionadas ao pneumococo, com um custo final total de US\$ 5,5 bilhões. Foi mostrado ainda que o pneumococo foi encontrado em 73% das pneumonias lobares, onde a infecção é mais disseminada e é caracterizada por apresentar na radiografia de tórax o lobo pulmonar opaco, e em 13% das broncopneumonias, onde a infecção ocorre em pontos do pulmão e na radiografia de tórax são vistos pontos de opacidade. (WEYCKER et al., 2010; WHO, 2012). No Brasil, entre os anos de 2004 e 2006, foram registrados mais de 34 mil hospitalizações associadas à infecção por pneumococo, e destas, quase 65% dos casos eram devidos à pneumonia (NOVAES et al., 2011). Um estudo mais recente mostrou que infecções do trato respiratório inferior (LRI) continuam sendo uma das maiores causas de morte em todas as faixas etárias no mundo todo, responsável por 2,7 milhões de mortes no ano de 2015. Dentre todas as faixas etárias, os menores de 5 anos são os mais afetados, com 703.917 mortes, sendo 392.964 por pneumonia pneumocócica (GBD 2015 LRTI collaborators, 2017).

1.3 VACINAS PNEUMOCÓCICAS

A OMS recomenda a introdução de vacinas pneumocócicas no calendário de vacinação de crianças, principalmente nos países com altas taxas de mortalidade infantil (WHO, 2012). Esta recomendação deve-se ao crescente número de cepas resistentes a antibióticos, como a penicilina e macrolídeos. Atualmente dois tipos de vacinas pneumocócicas são licenciadas no Brasil, as vacinas pneumocócicas polissacarídicas (PPV) e as vacinas pneumocócicas conjugadas (PCV). Estas vacinas induzem produção de anticorpos contra PS de pneumococo, mas com diferenças de efetividade e recomendação (BOGAERT et al., 2004a; MOFFITT et al., 2011; MIYAJI et al., 2013).

A primeira geração de vacinas contra pneumococos surgiu nos Estados Unidos, em 1983, e continha PS dos 23 sorotipos mais comuns em IPD (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F). A proteção garantida por esta vacina é independente de células T, consequentemente não há estimulação de células B de memória e a proteção é temporária. Esta vacina é indicada para pessoas maiores de 65 anos e crianças maiores de 2 anos de idade, mas com alguma característica de risco de doença pneumocócica. Estas vacinas capsulares podem, além de tudo, induzir uma resposta de hipersensibilidade nas administrações sequenciais à primeira dose. Além disso, estudos apontam que estas vacinas não são muito efetivas em crianças e adultos com um grau elevado de risco (CDC, 1997; HUSS et al., 2009).

A segunda geração de vacinas pneumocócicas baseou-se na conjugação de PS a proteínas carregadoras, tornando a resposta imunológica à vacina dependente de células T. Esta mudança foi capaz de aumentar a efetividade das vacinas pneumocócicas, principalmente em crianças menores de 2 anos (KAPLAN et al., 2002).

A primeira PCV a ser licenciada no mundo foi a PCV 7 valente, ou PCV7, no ano 2000. Esta vacina possuía os 7 sorotipos mais comuns naquele período nos Estados Unidos e Europa, isolados de IPD. Os sorotipos incluídos nesta vacina eram 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, e foram responsáveis por cerca de 80 a 90% dos casos de doença invasiva nos Estados Unidos e Europa no ano de licenciamento (KAPLAN et al., 2002). Os PS foram conjugados a uma proteína variante e não tóxica da toxina diftérica, a CRM₁₉₇. Com esta vacina foram obtidas altas concentrações de anticorpos contra os PS bacterianos, que foram capazes de diminuir a carga bacteriana dos sorotipos vacinais (VT) na nasofaringe. Inicialmente, a PCV7 foi utilizada apenas em crianças, consequentemente, houve uma redução nos casos de IPD neste grupo da população. Esta redução foi ainda mais drástica ao analisar apenas os casos de IPD relacionados aos VT (PELTON et al., 2003; BARNETT et al., 2015; WU et al., 2015).

A introdução da PCV7 nos programas de imunizações gerou, contudo, uma mudança nos sorotipos mais frequentes em IPD. Nos locais onde esta vacina foi utilizada, o número de casos de IPD provocados por sorotipos não incluídos na PCV7, os chamados sorotipos não vacinais (NVT), aumentou consideravelmente. Nos Estados Unidos, por exemplo, o sorotipo 19A tornou-se o mais prevalente em IPD após a introdução da PCV7 (HICKS et al., 2007). Este fato é importante, uma vez que o sorotipo 19A está diretamente relacionado com cepas resistentes a antibióticos, o que dificultaria o tratamento. Por outro lado, a proteção garantida

pela PCV7 não se limitou apenas aos grupos vacinados. Após a introdução desta vacina, foi observada a redução de casos de IPD por VT entre os grupos que não receberam a dose da vacina. Esta imunidade observada foi adquirida pelo grupo não vacinado por efeito rebanho (WHITNEY et al., 2003; BECHINI et al., 2009; BARNETT et al., 2015).

No Brasil, a PCV7 foi disponibilizada inicialmente pela rede particular de saúde no ano 2000 e foi introduzida no calendário nacional de vacinação de crianças menores de 5 anos e com algum fator de risco de doença pneumocócica em 2004 (SARTORI et al., 2010). Entretanto, foi estimado que a cobertura desta vacina contra os sorotipos causadores de IPD no Brasil era de aproximadamente 58%, uma vez que os sorotipos 1 e 5 eram prevalentes em todas as faixas etárias (BRANDILEONE et al., 2003).

Em 2009-2010, surgiram no mercado mundial duas novas vacinas pneumocócicas conjugadas após receberem aprovação de licenciamento em mais de 40 países. A vacina pneumocócica 10-valente (PCV10) é composta de PS dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados a uma proteína carregadora. A Proteína D, uma lipoproteína de superfície do *Haemophilus influenzae*, foi a proteína carregadora conjugada a PS de 8 sorotipos (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F), o toxóide tetânico foi conjugado ao PS do sorotipo 18C e o toxóide diftérico ao PS do sorotipo 19F. A PCV10 utiliza, como adjuvante, o fosfato de alumínio. Cada dose de 0,5ml possui 1µg dos PS dos sorotipos 1, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F, e 3 µg dos sorotipos 4, 18C e 19F. Para imunização completa é indicada a administração de 3 doses da vacina com um intervalo de pelo menos 4 semanas entre as doses. A proteção garantida pela PVC10 foi superior à PCV7, uma vez que a inclusão dos sorotipos 1, 5 e 7F melhorou a cobertura vacinal desta formulação (PRYMULA et al., 2009; WHO, 2012).

A outra vacina conjugada desenvolvida naquele mesmo ano possui PS dos sorotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F, todos individualmente conjugados à proteína carregadora CRM₁₉₇. A dose administrada da vacina pneumocócica 13-valente (PCV13) consiste em 0,5ml da vacina, que contém 4µg do PS do sorotipo 6B e 2µg dos outros 12 sorotipos. Como adjuvante, assim como a PCV10, é utilizado o fosfato de alumínio. Assim como a PCV10, a imunização completa com a PCV13 consiste na administração de 3 doses da vacina com intervalo de pelo menos 4 semanas. A PCV13 apresentou uma boa imunogenicidade, segurança e tolerância, comparável à PCV7, tornando-a sua substituta (BRYANT et al., 2010; WHO, 2012).

No ano de 2009 o Ministério da Saúde (MS) licenciou a PCV10 e, no ano seguinte, ela foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI). A PCV10 é administrada em 2 doses para crianças aos 2 e 4 meses, mais uma dose de reforço preferencialmente aos 12 meses, mas possível até os 4 anos de idade (BRASIL, 2011; 2015). Com esta medida, houve uma redução significativa de IPD, pneumonia, otite média e também de colonização, tanto no grupo vacinado quanto nas pessoas que não receberam nenhuma dose da vacina (DOS SANTOS et al., 2013; MOREIRA et al., 2016). Com a implementação desta vacina foi estimado que cerca de 10 mil mortes poderiam ser evitadas e haveria uma economia de mais de 1 bilhão de reais aos cofres públicos com gastos diretos com cuidados médicos em 25 anos (SARTORI et al., 2010). Um estudo mostrou que, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, a incidência de casos de doenças pneumocócicas causadas por sorotipos vacinais caiu de 16,47 para 0,44 em grupos da mesma faixa etária após a vacinação com a PCV10. Neste mesmo trabalho, foi mostrado que no período que sucedeu a PCV10 houve um decréscimo no número de isolados clínicos resistente à penicilina (DOS SANTOS et al., 2013). Apesar da redução significativa de IPD por VT, a cobertura vacinal da PCV10 é relativamente baixa se compararmos os 59,3% de cobertura preditos para PCV10 contra os 72% da PCV13 (FRANCO et al., 2010).

Outro ponto importante a se ressaltar sobre as PCVs é que, enquanto sua eficácia na prevenção de IPD causada por VT é largamente aceita, o efeito sobre pneumonia não-invasiva é controverso. Diversos estudos indicam que a eficácia na prevenção de pneumonia não-invasiva seria consideravelmente mais baixa do que IPD (LOO et al., 2014).

1.4 PRÓXIMA GERAÇÃO DE VACINAS E ANTÍGENOS PROTEICOS

As vacinas baseadas nos PS de pneumococos ainda hoje representam uma importante maneira de redução e controle de doenças pneumocócicas. Entretanto, existe a limitação da proteção limitada aos VT. A inclusão de mais sorotipos nas vacinas é inviabilizada pelo alto custo de fabricação da formulação, uma vez que a conjugação é uma reação de baixo rendimento, encarecendo todo o processo. A substituição de prevalência por NVT e aumento de cepas resistentes a antibióticos são ainda fatores muito importantes a diminuir a efetividade destas vacinas. Deste modo, as vacinas que não sejam sorotipo-específicas seriam um importante método para aumentar a eficácia das vacinas pneumocócicas (BOGAERT et al., 2004b; MIYAJI et al., 2013).

Existem hoje diferentes estratégias vacinais em teste como substitutas das tradicionais PCVs. Pensou-se em conjugar PS com proteínas de pneumococo ou simplesmente combinar as PCVs com essas proteínas. Existe a possibilidade de utilização exclusiva de antígenos proteicos na formulação, ou ainda a formulação de uma vacina utilizando toda a célula bacteriana (MOFFITT et al., 2011). Algumas proteínas pneumocócicas são antígenos vacinais em potencial, como a PspA, para uso exclusivo em uma vacina ou para aumentar a efetividade das PCVs. Entretanto, o uso de proteínas pode não apresentar a mesma resposta em indivíduos diferentes, sendo necessário o uso de combinações de proteínas para minimizar o risco e também a utilização de adjuvantes na formulação. Entretanto, há ainda um risco de estes antígenos não serem tão imunogênicos em humanos como nos testes animais, uma vez que esta bactéria é um patógeno exclusivamente humano (OGUNNIYI et al., 2007; DENOEL et al., 2011; MIYAJI et al., 2013). Dentre as proteínas do *S. pneumoniae*, PspC, Ply, PsaA, e PspA, são importantes candidatas a antígeno vacinal. PspA é um antígeno especialmente promissor por estar associado à proteção contra a colonização e contra doenças invasivas (BRILES et al., 2001).

1.4.1 PspA COMO ANTÍGENO VACINAL

A proteína PspA é encontrada em todos os isolados de pneumococos e é uma molécula necessária para virulência da bactéria. Está ancorada na parede bacteriana, mas parte da proteína é exposta na superfície da cápsula. Esta proteína possui tamanho variando de 67 a 99 kDa, dividida em 5 regiões distintas: um peptídeo sinal de exportação; uma região N-terminal em α -hélice; uma região rica em prolina; uma região com uma repetição de 20 aminoácidos, altamente conservada; e uma porção C-terminal com poucos resíduos hidrofóbicos (Figura 4) (YOTHER et al., 1992).

A região C-terminal é a porção da molécula que está fixada à superfície bacteriana por interação não covalente com resíduos de colina dos ácidos teicoico e lipoteicoico. A região C-terminal que compreende a porção com repetições de aminoácidos é denominada região de ligação à colina (CBR) (YOTHER et al., 1992; YOTHER et al., 1994). A porção N-terminal é polar e altamente carregada eletricamente, interagindo por repulsão com as moléculas da cápsula, que também são eletronegativas. Esta porção é a responsável por evitar a deposição de C3 do sistema complemento, impedindo a fagocitose da célula bacteriana por células do sistema imune (TU et al., 1999; REN et al., 2004). Essa região compreende ainda o domínio de ligação à lactoferrina, impedindo a ação bactericida da apolactoferrina (SHAPER et al., 2004). A porção rica em prolina funciona como uma corrente, dando flexibilidade e movimento à porção N-terminal (YOTHER et al., 1992; YOTHER et al., 1994).

Com a utilização de anticorpos monoclonais (MAb) para identificação de epítomos de PspA, foi possível classificar esta proteína em 31 tipos diferentes. Comparando, então, estes resultados com a identificação das bactérias por sorotipo da cápsula e tamanho da proteína, foi possível classificar a PspA em 50 tipos diferentes. Estes dados sugeriram que esta proteína é bastante variável (CRAIN et al., 1990). O sequenciamento completo de diferentes isolados confirmou que o gene *pspA* é um mosaico de regiões que sofreram recombinações gênicas e tem uma importância com a interação com as células do hospedeiro (CRAIN et al., 1990; HOLLINGSHEAD et al., 2000). A PspA foi então dividida em famílias com base na sequência da região N-terminal imediatamente anterior à região rica em prolina, a região definidora de clado (CDR). A PspA foi classificada em 3 famílias e subdivididas em 6 clados. A família 1 inclui os clados 1 e 2, a família 2 inclui os clados 3, 4 e 5, enquanto que a família 3 inclui o clado 6. A maior parte dos isolados expressa PspA de família 1 ou 2, com raros pneumococos com PspA de família 3 (HOLLINGSHEAD et al., 2000).

Foi demonstrado que PspA de clado 4 (PspA4) e PspA de clado 5 (PspA5) induzem anticorpos com alta reatividade cruzada com as outras PspA, mediando a deposição de moléculas do sistema complemento na superfície da bactéria. Estas duas variantes da PspA seriam, portanto, importantes candidatas vacinais capazes de induzir proteção contra várias cepas de pneumococo (MORENO et al., 2010). A mistura de PspA e Ply mostrou-se mais eficaz na proteção contra doenças invasivas, inclusive em modelo de proteção passiva contra 2 sorotipos virulentos de pneumococo (OGUNNIYI et al., 2000). A mistura de PspA e PsaA por via intranasal mostrou-se a formulação mais eficaz em proteger animais contra a colonização de pneumococo, com a presença de altas concentrações de anticorpos séricos

(BRILES et al., 2000). Esses dados indicam que estes antígenos podem ser ótimos candidatos vacinais, ou ainda adicionados às vacinas conjugadas, aumentando a proteção contra bacteremia, sepse e pneumonia (BRILES et al., 2001).

1.5 VACINAS PULMONARES

A administração pulmonar é uma via de inoculação interessante por se tratar de um método de vacinação não-invasivo. Quando comparada à administração pelo trato gastrointestinal (TGI), a inoculação no pulmão é mais favorável à estabilidade de proteínas, já que o órgão possui uma menor concentração de proteases (CRYAN, 2005; TAWFEEK et al., 2013). O pulmão possui ainda uma área superficial muito grande, o que melhora a distribuição e aumenta a absorção das formulações, além de apresentar uma fina camada epitelial, densa vascularização e rápida absorção. O pulmão possui uma densa população de células apresentadoras de antígenos (APC), dentre as quais células dendríticas (DC), macrófagos alveolares (AM) e células B seriam alvos em potencial para vacinas. Com isso, as vacinas pulmonares poderiam induzir uma imunidade local e sistêmica, tornando-as melhores que as atuais administrações, especialmente contra patógenos respiratórios (CRYAN, 2005; BLANK et al., 2011; KUNDA et al., 2013).

Uma possível formulação vacinal poderia ser administrada por via inalatória de uma vacina seca ou por nebulização da vacina líquida. Dentre os aparelhos comumente utilizados para a administração pulmonar estão nebulizadores, inaladores de pó e inaladores de dose calibrada. A escolha do aparelho é de grande importância para garantir, além da estabilidade da formulação, a maior deposição da formulação no local de interesse. Durante o desenvolvimento de uma vacina pulmonar outro fator importante a ser considerado é a facilidade de uso do aparelho pela população alvo. Além do mais, o custo de fabricação deve ser relativamente baixo. A utilização de uma formulação na forma de pó inalatório dispensaria utilização de um sistema de refrigeração, facilitando o processo de armazenamento e transporte, além de aumentar a estabilidade física e microbiológica das vacinas, se comparadas às formulações líquidas atuais (CRYAN, 2005; KUNDA et al., 2013; TAWFEEK et al., 2013; TONNIS et al., 2013).

A via pulmonar é uma rota estabelecida e já muito estudada como via de administração de várias drogas e proteínas. Vários fármacos proteicos com administração pulmonar e ação sistêmica encontram-se em fase de testes clínicos, alguns inclusive já foram comercializados.

Em muitos casos, o fármaco é formulado em sistemas de entrega (*delivery systems*) baseados em nanopartículas (NPs) que visam maior controle de liberação e direcionamento das formulações (FU et al., 2002; LASSMANN-VAGUE et al., 2006).

1.6 POLÍMEROS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE NPs

Os benefícios advindos da nanotecnologia vão desde a fabricação de tecidos e fibras inteligentes a eletrônicos, abrangendo agricultura, astronomia, ciências forenses e terapias médicas (KUMARI et al., 2010). NPs de prata, por exemplo, vem sendo utilizadas na produção de alimentos, cosméticos, roupas e vários outros produtos, como um ótimo agente bactericida (MARAMBIO-JONES et al., 2010). A utilização de NPs como mecanismos de entrega e direcionamento de fármacos (*drug delivery*) já é uma realidade. Um estudo mostrou que células cancerosas de pâncreas foram controladas após a utilização de NPs carregadas com uma molécula inibidora de um gene mutado. Esta formulação mostrou-se mais eficiente que o tratamento convencional (LUCERO-ACUÑA et al., 2014).

Nos casos em que a ação do medicamento ou da molécula de interesse tem ação intracelular, as NPs têm um papel importante no direcionamento do fármaco, ou outra molécula de interesse, para dentro da célula alvo. O processo de internalização das NPs pelas células alvo é dinâmico e envolve endocitose, exocitose e escolha do compartimento celular alvo. A interação entre as superfícies da célula-alvo e das NPs é importante para sua internalização (VASIR et al., 2007).

Atualmente, vários polímeros são utilizados como componentes de sistemas nanoparticulados com controle de liberação do fármaco para uso terapêutico, melhorando a seletividade de atuação e aumentando o impacto terapêutico. Um dos polímeros mais utilizados é o poli-D,L-láctico-co-glicólico (PLGA). No organismo, o PLGA é degradado em dois monômeros, os ácidos láctico e glicólico. Estes dois compostos são bem tolerados pelo organismo, apresentando um risco mínimo de toxicidade sistêmica. O PLGA é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão regulatório dos Estados Unidos. Possui aplicação no desenvolvimento de medicamentos proteicos, terapia gênica e como um veículo de antígenos em vacinas (MUNDARGI et al., 2008; KUMARI et al., 2010). Entretanto, alguns dos problemas na utilização da PLGA para a formulação de NPs encontram-se na transposição de escala, custo de produção elevado e baixa aderência das moléculas de interesse (DANHIER et al., 2012).

A utilização de compostos derivados ou combinação de dois ou mais polímeros para a fabricação de NPs é comum. Em um trabalho de desenvolvimento de NPs de PLGA, foi utilizada a polietilenoimina (PEI) para recobrir a superfície das NPs e com isso alterar a carga. PEI é um polímero catiônico que se apresenta altamente carregado positivamente quando em solução aquosa. A utilização do PEI na superfície das NPs de PLGA aumentou a eficiência de adsorção do gene de interesse às NPs. Este modelo de vacina foi utilizado para a administração intrapulmonar de NPs contendo o gene para um antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. Com apenas uma dose da formulação e uma dose de reforço com a proteína de *M. tuberculosis*, foi observada uma elevada imunogenicidade com alta taxa de proliferação de células T e produção de interferon- γ (IFN- γ) (BIVAS-BENITA et al., 2004a; BIVAS-BENITA et al., 2009).

Outro polímero muito estudado como base para o desenvolvimento de NPs é a quitosana. Ela é uma molécula biodegradável e não tóxica, largamente aplicada como um agente para controle da ingestão de colesterol. A quitosana é uma molécula catiônica e possui aderência ao muco. Sendo assim, esta molécula é uma importante candidata para direcionamento e entrega de moléculas, proteicas ou nucleotídicas, em mucosas. Foi demonstrado que NPs de quitosana inoculadas por via pulmonar foram eficientes na entrega e direcionamento de vacina de DNA codificando um antígeno contendo múltiplos epítomos de *M. tuberculosis*, além de proteger o DNA de degradação. Esta formulação foi capaz de induzir a maturação de DCs, resultando num aumento de produção de IFN- γ por células T (BIVAS-BENITA et al., 2004b).

Pululan carregando grupo colesteril (CHP) é outro composto com aplicações em nanoformulações. CHP forma uma matriz complexa originando nanogéis, estruturas nanométricas dispersas no líquido. Esta rede formada envolve, protege e estabiliza as proteínas de interesse para ação biológica. Como um sistema de distribuição de moléculas, estas estruturas melhoram a internalização por parte das células (AYAME et al., 2008). A utilização de nanogéis de CHP catiônico (cCHP) como um sistema de distribuição e direcionamento da PspA, em modelo de imunização intranasal, mostrou uma proteção significativa contra a colonização e doença invasiva por pneumococo em camundongos. Além disso, foi observada indução de imunidade sistêmica e de mucosa, com elevadas concentrações de imunoglobulina G (IgG) sérica e imunoglobulina A (IgA) nas mucosas e brônquios (KONG et al., 2013). Macacos rhesus também foram imunizados com esse nanogel

e foi observada indução de anticorpos IgG no soro, anticorpos IgA no lavado nasal e indução de uma resposta de citocinas com padrão Th1/Th17 (ZHANG, 2017).

Outro exemplo de polímero é o poli D,L-lactídeo (PLA), que representa uma ótima forma de desenvolvimento de um sistema biodegradável para melhoramento da resposta imunológica de antígenos proteicos (JIANG et al., 2001). A utilização de PLA para o encapsulamento e direcionamento da PspA já foi descrito. No trabalho, foi utilizada uma emulsão água-óleo-água, onde a primeira fase aquosa continha PspA dissolvida e levada à secagem por atomização (*spray drying*) ou secagem dupla do solvente para formação das partículas. Após a administração de duas doses, por via intramuscular, da ressuspensão destas micropartículas com a PspA encapsulada e tendo o alum como adjuvante, foi observada uma produção significativa de IgG no soro dos animais imunizados com as partículas, independente da forma de secagem do solvente (ANISH et al., 2014).

Polímeros de polianidrido são outras moléculas importantes para o desenvolvimento de novos modelos vacinais. A utilização deste polímero para encapsulação de antígenos mostrou-se eficaz na proteção de moléculas contra a degradação ao longo do tempo, aumentando o período de armazenamento desta formulação, e ainda preservando a estrutura e atividade biológica do antígeno proteico (CARRILLO-CONDE et al., 2010; PETERSEN et al., 2012). Foi demonstrado ainda que partículas polianidrídicas possuem uma importante ação adjuvante por ativar, melhorar a apresentação de antígenos pelas DCs, além de estimular a produção de citocinas (PETERSEN et al., 2009; TORRES et al., 2011). Uma formulação de polianidrido contendo PspA já foi descrita. No trabalho, PspA liofilizada foi co-dissolvida com o polímero, sonicada para melhor homogeneização e, para a recuperação das partículas, foi feita uma filtração à vácuo. Após 7 semanas da administração de uma dose por via subcutânea, foi observado um título elevado de anticorpos específicos, comparável ao grupo que recebeu o monofosforil lipídeo A (MPLA) como adjuvante (HAUGHNEY et al., 2013).

Outro polímero utilizado para síntese de NPs para aplicação vacinal é o poli(glicerol-adipato-co- ω -pentadecalactona) (PGA-co-PDL). Este poliéster pode ser sintetizado por lipases de *Candida albicans* ou por reação química independente de células vivas. O PGA-co-PDL possui uma elevada hidrofiliabilidade devido à presença de várias hidroxilas ao longo da cadeia. Entretanto, estas estruturas podem ser removidas por reações químicas, tornando o polímero mais lipofílico. A aplicação deste composto está geralmente associada a formulações pulmonares. O uso do PGA-co-PDL como um sistema de distribuição de

medicamentos apresenta uma boa efetividade para fármacos, macromoléculas, proteínas e peptídeos. Estruturas formuladas a partir deste composto apresentam uma baixa toxicidade, comparável ao PLGA (TAWFEEK et al., 2011).

1.7 NPs DE PGA-co-PDL CONTENDO PspA COMO MODELO DE VACINA PULMONAR

NPs de PGA-co-PDL contendo o antígeno PspA4Pro foram produzidas como modelo de vacina pulmonar contra pneumonia pneumocócica. PspA4Pro é uma proteína recombinante de PspA pertencente ao clado 4, composta pela região N-terminal madura em α -hélice e o primeiro bloco da região rica em prolina. Esta proteína foi capaz de induzir anticorpos com reatividade cruzada com os clados 1 ao 5 (DARRIEUX et al., 2008; MORENO et al., 2010).

Para a produção em larga escala, o gene que codifica PspA4Pro foi inserido no plasmídeo pET37b+ para transformação e expressão de *Escherichia coli*. O crescimento das bactérias foi feito em reatores de 5 litros com controle automático de temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Após o cultivo, PspA4Pro foi recuperada e purificada. Nesta etapa foi feita a separação das células, ruptura das células bacterianas, clarificação, cromatografia de troca aniônica, crioprecipitação em pH 4, seguida de cromatografia de troca catiônica. Com este processo foi obtida uma recuperação de aproximadamente 35% da PspA4Pro com uma pureza de 97,8% e uma redução da concentração de endotoxinas maior que 99%. Os testes pós-purificação mostraram que esta proteína manteve sua estrutura secundária e atividade biológica (FIGUEIREDO et al., 2016).

NPs foram então formuladas com o polímero PGA-co-PDL com posterior adsorção de moléculas de PspA4Pro. As NPs contendo PspA4Pro (NP PspA4Pro) passaram por um processo de secagem por atomização (*spray-dry*) com adição de L-leucina, para formação de micropartículas carregadoras nanocompostas (NCMPs), facilitando a dispersão e deposição no pulmão. Estudos iniciais mostraram que esta formulação (NP/NCMP PspA4Pro) apresentou uma boa estabilidade na liberação de PspA4Pro, mantendo a integridade e atividade da molécula, além de favorecer a internalização das NP PspA4Pro pelas DCs (KUNDA et al., 2015b).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O desenvolvimento de vacinas alternativas contra infecções pneumocócicas é de suma importância já que as atuais vacinas disponíveis possuem cobertura restrita de sorotipos e o aumento de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos é uma realidade. A inclusão de mais sorotipos é invalidada pelo alto custo de produção que seria empregado nesta nova formulação. Outro fator que justifica o desenvolvimento de vacinas pneumocócicas alternativas é que as atuais vacinas possuem menor eficácia contra doenças não-invasivas, incluindo pneumonia. Uma alternativa seria o uso de uma formulação baseada em NPs contendo o antígeno PspA e inoculada por via pulmonar. O desenvolvimento de uma vacina seca de administração intrapulmonar, que é a proposta deste trabalho, além de diminuir gastos com a produção da vacina, diminuiria também gastos no processo pós-fabricação, pois não seria necessária uma cadeia fria para transporte e armazenamento, e facilitaria sua administração, que seria realizada por um *spray* seco para aspiração ou realizada por nebulizadores.

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a imunogenicidade e eficácia de NPs de PGA-co-PDL contendo o antígeno PspA4Pro e formuladas em partículas micrométricas (NP/NCMP PspA4Pro) em modelo murino de imunização pulmonar. Sendo assim, foram estipulados objetivos específicos:

- Avaliação de técnicas que possibilitem a administração pulmonar da vacina em camundongos;
- Avaliação da indução de anticorpos anti-PspA4Pro no soro e lavado broncoalveolar (BALF);
- Avaliação da ligação de anticorpos recuperados do soro a diferentes linhagens de pneumococo;
- Quantificação do total de bactérias no pulmão após desafio, realizado com duas linhagens de pneumococo;
- Quantificação de citocinas liberadas no pulmão e recuperadas no BALF;
- Imunofenotipagem das células infiltradas no pulmão e recuperadas no BALF;
- Avaliação da proteção em um modelo de desafio letal contra pneumococo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FORMULAÇÕES VACINAIS

A proteína PspA4Pro foi produzida pelo grupo da Dr^a. Viviane Maimoni Gonçalves do Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto Butantan. As formulações de NP/NCMP foram produzidas pelo grupo do Dr. Imran Saleem da Liverpool John Moores University (Reino Unido). Foi utilizado gene da PspA4Pro (MORENO et al., 2010) em vetor pET37b+ para expressão em *E. coli* em reator de 5 litros. A PspA4Pro foi recuperada e purificada por cromatografia de troca aniônica, seguida de crioprecipitação em pH 4 e cromatografia de troca catiônica (FIGUEIREDO et al., 2016). Esta proteína, então, foi adsorvida em NPs formuladas com o polímero PGA-co-PDL. As NPs contendo PspA4Pro passaram por um processo de secagem por atomização (*spray-dry*) com adição de L-leucina, para formação de NCMPs (NP/NCMP PspA4Pro) (Figura 5) (KUNDA et al., 2015b).

Figura 5 - Nanopartículas de PGA-co-PDL adsorvidas com PspA4Pro.

Imagens feitas por microscopia eletrônica de transmissão de NPs feitas de PGA-co-PDL vazias em aumento de 110.000x (escala – 100nm) (A). Após o processo de adsorção da PspA4Pro e secagem por atomização numa solução de L-leucina são obtidas NCMPs, aqui vistas por imagens de microscopia eletrônica de escaneamento (escala - 2µm).

Fonte: A - KUNDA et al. (2015a); B - KUNDA et al. (2015b).

3.2 LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As linhagens de pneumococo foram cultivadas em meio líquido Todd-Hewitt (Difco) suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY) a 37°C sem a necessidade de agitação. Antes do cultivo em caldo THY, as bactérias são cultivadas inicialmente em meio sólido de ágar-sangue (Laborclin) por 16-18h para então serem transferidas para o THY. Estoques das

bactérias são armazenados à temperatura de -80°C em meio THY contendo 20% de glicerol. As linhagens EF3030, D39 e 3JYP2670 foram gentilmente cedidas pelo Dr. David Briles (University of Alabama at Birmingham). A linhagem M10 foi generosamente cedida pela Dr^a. Ana Lucia Andrade (Universidade Federal de Goiás, Brasil). A linhagem ATCC6303 foi gentilmente cedida pela Dr^a. Maria Cristina Brandileone (Instituto Adolfo Lutz, Brasil).

3.3 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS

Camundongos fêmeas SPF (*specific pathogen free*) de 5 a 7 semanas foram adquiridos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan sob o Protocolo 1160/13.

3.3.1 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM INSUFLADOR PULMONAR

Para este experimento, camundongos BALB/c fêmeas (5 animais por grupo) foram anestesiados com solução de xilazina+quetamina (20+100 $\mu\text{g/g}$) e imunizados por via intrapulmonar com a utilização de insuflador (Penn Century Inc) (Figura 6). O aparelho foi carregado com NP/NCMP PspA4Pro contendo o equivalente a 0,4 μg de PspA4Pro. A quantidade de pó colocada no insuflador foi de 1 mg, ajustada com a adição do veículo leucina. Para a imunização subcutânea, os animais receberam 100 μl da solução de proteína.

Figura 6 - Insuflador pulmonar.

Dispositivo de para injeção de ar (A) com o botão de acionamento (B) que leva a quantidade de ar ajustada para a parte onde o pó é armazenado para a administração (C) e cânula intratraqueal para a administração (D).

3.3.2 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM MICROSPRAYER

Camundongos BALB/c fêmeas (5 animais por grupo) foram anestesiados com solução de xilazina+quetamina (20+100 $\mu\text{g/g}$) e imunizados por via intrapulmonar através do *Microsprayer* (Penn Century Inc) (Figura 7). Para o carregamento do aparelho, as NP/NCMPs

foram ressuspensas em salina numa concentração de 0,01 mg/μl, equivalente a 2μg de PspA4Pro, e o ajuste foi feito de modo a dispensar 50μl a cada acionamento. Para a imunização subcutânea, os animais receberam 100μl da solução de proteína purificada apenas.

3.3.3 IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS COM MICROPIPETA

Camundongos BALB/c fêmeas (5 a 6 animais por grupo) foram anestesiados com solução de xilazina+quetamina (20+100μg/g) e imunizados através de instilação com a utilização de micropipeta. Para isso, foram inoculados 50μl de uma ressuspensão das NP/NCMPs em salina numa concentração de 0,01 mg/μl, equivalente a 2μg de PspA4Pro. Para a imunização subcutânea, os animais receberam 100μl da solução de proteína purificada apenas. Como outro controle, animais foram imunizados por instilação intrapulmonar com 50μl de uma solução da proteína purificada. Na Figura 8 é possível observar o esquema resumido das atividades realizadas com este modelo de administração. Teste da técnica de instilação foi realizado com o corante *Evans Blue* (0,05%).

3.3.4 OBTENÇÃO DE SORO E BALF

Após 14 dias da imunização dos animais, foram retirados cerca de 200µl de sangue por punção retroorbital para recuperação do soro. Após 21 dias da última imunização, os animais foram sacrificados e foi feita a coleta do BALF. Os animais foram eutanasiados com uma dose letal de solução de xilazina+quetamina (60+300µg/g) e uma cânula acoplada a uma seringa foi inserida na traqueia. Foram então realizadas lavagens dos pulmões com 0,5 ml e 1,0 ml PBS.

3.3.5 DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS NO SORO E BALF

Para a detecção de anticorpos no soro dos animais, foi realizado ensaio de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Placas de 96 poços (Maxisorp, Nunc) foram sensibilizadas com o antígeno PspA4Pro (5µg/ml) em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 50mmol/l; NaHCO_3 50mmol/l; pH 9,6) e deixadas a 4°C por cerca de 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (PBS; Tween 20 0,05%). Para o bloqueio, foram adicionados às placas 100µl de solução PBS/BSA 1% (PBS; Albumina bovina sérica (BSA) 1%) e, após 30 minutos a 37°C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. As placas foram então incubadas com diluições seriadas dos soros em PBS/BSA 1%, incubadas por 1 hora a 37°C e lavadas posteriormente 3 vezes com PBS-T. Anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich) (1/5000 em PBS/BSA 1%) foram adicionados e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T. Foi adicionado a cada poço o substrato ortofenildiamina (OPD), com a utilização de solução de revelação (Citrato de sódio 100mmol/l; NaH_2PO_4 300mmol/l; OPD 3,7mmol/l; H_2O_2 0,01%). Esta reação foi interrompida com solução H_2SO_4 1,25M, e as absorbâncias foram determinadas por leitora de ELISA com o comprimento de onda de 492nm. Com os valores da absorbância foi determinado o título de anticorpos no soro dos animais, onde se considera o título como o inverso da maior diluição com absorbância maior ou igual a 0,1.

Para a detecção das subclasses IgG1 e IgG2a no soro dos animais foi utilizado, respectivamente, anti-IgG1 de camundongo produzido em ovelha (Southern Biotech) (1/1000 em PBS/BSA 1%) e anti-IgG2a de camundongo produzido em ovelha (Southern Biotech) (1/1000 em PBS/BSA 1%). Em seguida, foi utilizado anticorpo anti-IgG de ovelha produzido em coelho conjugado com peroxidase (Southern Biotech) (1/1000 em PBS/BSA 1%).

Para a detecção de anticorpos IgG no BALF, foi utilizado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Southern Biotech) (1/5000 em PBS/BSA 1%). Para a detecção de anticorpos IgA no BALF, foram utilizados anticorpo anti-IgA de camundongo produzido em ovelha (Southern Biotech) (1/4000 em PBS/BSA 1%) e anticorpo anti-IgG de ovelha conjugado com fosfatase alcalina (Southern Biotech) (1/5000 em PBS/BSA 1%). A detecção foi realizada com o substrato p-Nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma-Aldrich), com a utilização de solução de revelação (p-NPP 1mg/ml; Água deionizada qsp). Após 30 minutos, as absorbâncias foram determinadas por leitora de ELISA com o comprimento de onda de 405nm.

3.3.6 LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS DO SORO À SUPERFÍCIE INTACTA DE BACTÉRIAS DE DIFERENTES LINHAGENS

Isolados de pneumococo das linhagens EF3030 (sorotipo 19F, PspA1), D39 (sorotipo 2, PspA2), M10 (sorotipo 11A, PspA3), 3JYP2670 (sorotipo 3, PspA4) e ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5) foram cultivados em placas de ágar-sangue (Laborclin) por 24 horas em estufa a 37°C. Após este período, as bactérias foram transferidas para meio líquido THY e cultivadas até uma densidade óptica a 600nm (DO_{600nm}) de 0,4-0,5 (aproximadamente 10^8 UFC/ml) e recuperadas após centrifugação. As bactérias foram lavadas, ressuspendidas em PBS e incubadas com 1% de uma mistura de soros de animais do mesmo grupo por 30 minutos a 37°C. As amostras previamente lavadas com PBS foram então incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à FITC (Sigma) por 30 minutos no gelo. As amostras foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com a solução Cytofix (BD Biosciences) e armazenadas a 4°C até o momento da leitura das amostras. As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences). Para ajuste do *Forward scatter/Side scatter*, *Forward scatter-Height/Forward scatter-Area* foram utilizadas células bacterianas não marcadas. Para diminuir qualquer interferência, como de resíduos de células mortas e aglomerado de células, foram feitos *gates* e determinada a leitura de pelo menos 10.000 eventos por amostra. Os dados obtidos foram analisados com utilização do software Flow Jo v10.

3.3.7 DESAFIO INTRANASAL

Camundongos BALB/c fêmeas foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de xilazina+quetamina (20+100µg/g). Em seguida, os grupos receberam 50µl de uma suspensão de *S. pneumoniae* da linhagem ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5), por via nasal,

numa concentração de 5×10^4 unidades formadoras de colônias (UFC)/50 μ l. Após 12 horas, os animais foram sacrificados para coleta do BALF. O volume total foi determinado para posterior cálculo da quantidade total de UFC nos animais. Foram feitas 7 diluições seriadas das amostras de BALF num fator de 1/10, seguido de plaqueamento em meio ágar-sangue (Laborclin) contendo 4 μ g/ml de gentamicina. Após um período de incubação de 24 horas em estufa a 37°C numa situação de microaerofilia, foi feita a contagem de UFC e, com o volume recuperado, foi determinado o número total de UFC. Foi realizado ainda experimento para avaliação de sobrevivência final após o desafio, com acompanhamento durante 10 dias. Outro modelo de desafio foi realizado com a utilização da linhagem EF3030 (sorotipo 19F, PspA1) numa concentração de 10^7 UFC/50 μ l e animais sacrificados 24 horas após o desafio para a coleta do BALF.

3.3.8 DETECÇÃO DE CITOCINAS NO BALF E IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS

As amostras de BALF foram levadas à centrifugação e o sobrenadante foi separado das células infiltradas no pulmão. Com o sobrenadante, foi feita a quantificação de citocinas através do kit de determinação baseado na técnica de Luminex (Milliplex Map Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Merck Millipore) para a detecção de IFN- γ , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL17A, KC/CXCL1, MCP-1/CCL-2, MIP-2/CXCL2 e TNF- α . As células recuperadas do BALF foram ressuspensas em 500 μ l de tampão FACS (PBS; FBS 2%; Azida sódica 0,02%) e os tubos levados à centrifugação a 1500rpm por 5 minutos. As células foram então ressuspensas em 100 μ l da diluição 1:100 do mix de anticorpos anti-F4/80 PE-Cy7, anti-CD11c APC, anti-CD11b BB515, anti-CD4 APC-Cy7, anti-CD8 PerCP-Cy5.5, anti-B220 PE, anti-Ly6G BV421 (BD Biosciences). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C sob proteção da luz e após esta etapa foi feita a lavagem com tampão FACS. As amostras foram ressuspensas em 200 μ l de tampão FACS e adicionado 100 μ l do fixador Cytofix (BD Biosciences). As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences). Para ajuste da compensação dos fluorocromos, foram utilizadas esferas de látex *CompBeads* (BD Biosciences) marcadas com os fluorocromos utilizados e para ajuste do *Forward scatter/Side scatter*, *Forward scatter-Height/Forward scatter-Area* foram utilizadas células não marcadas. Para diminuir qualquer interferência, como de resíduos de células mortas e aglomerado de células, foram feitos *gates* e determinada a leitura de 30.000

eventos por amostra. Os dados obtidos foram analisados com utilização do software Flow Jo v10.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad 5 (Prism). As diferenças entre os grupos na proliferação celular, nível de anticorpos, UFC, citocinas/quimiocinas e células infiltradas no BALF foram analisadas por One-way ANOVA com o pós-teste de Tukey, a diferença na razão de anticorpos IgG1 e IgG2a foi analisada por Teste t não-pareado, a diferença no tempo de sobrevivência foi analisada por Teste Log-rank (Mantel-Cox) e a diferença de sobrevivência entre os grupos foi analisada pelo Teste Exato de Fisher.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DO INSUFLADOR PULMONAR

Camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados com o uso de um insuflador pulmonar para administrar na forma de pó NP/NCMP vazia ou NP/NCMP PspA4Pro contendo o equivalente a 0,4 µg de PspA4Pro. Como controle, um grupo de animais recebeu salina por via subcutânea e outro grupo recebeu 1 µg de PspA4Pro (proteína purificada apenas) por via subcutânea. Durante o processo de imunização intrapulmonar dos camundongos, um animal não sobreviveu, indicando tratar-se de um procedimento invasivo. Optamos, portanto, por não inocular uma segunda dose e avaliar resposta de indução de anticorpos no soro dos animais. Além disso, foi observado que boa parte da dose que deveria ser inoculada no animal permaneceu no insuflador, dificultando o controle da dose administrada.

A Figura 9 mostra os títulos de IgG anti-PspA4Pro dosados no soro. Apenas animais imunizados com PspA4Pro por via subcutânea apresentaram indução de anticorpos com diferença estatisticamente significativa em relação aos animais inoculados com salina, mas mesmo neste grupo, a resposta não foi homogênea.

Figura 9 - Título de anticorpos séricos em animais imunizados com insuflador pulmonar.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas e o título de anticorpos no soro coletado 14 dias após a imunização foi determinado por ELISA. * Indica diferença estatisticamente significativa com o grupo salina (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

4.2 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM O *MICROSPRAYER*

Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com uma ressuspensão das NP/NCMPs através do uso de um *microsprayer* para administração pulmonar. Foi utilizada a ressuspensão de NP/NCMP vazia ou NP/NCMP PspA4Pro contendo o equivalente a 2 µg de PspA4Pro. Como controle, um grupo de animais recebeu salina por via subcutânea e outro grupo recebeu 5 µg de PspA4Pro (proteína purificada apenas) por via subcutânea. A imunização consistiu em duas doses com um intervalo de 14 dias entre cada dose.

Após a primeira dose foi possível observar um aumento significativo de anticorpos IgG anti-PspA4Pro apenas do grupo que recebeu PspA4Pro por via subcutânea, entretanto os dados não foram muito homogêneos (Figura 10A). Após a administração da segunda dose da imunização, foi observado um aumento expressivo e mais homogêneo no grupo que recebeu PspA4Pro por via subcutânea. O grupo que recebeu NP/NCMP PspA4Pro com o auxílio do *microsprayer* apresentou uma média aumentada em relação aos grupos controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 10B).

Figura 10 - Título de anticorpos séricos em animais imunizados com *microsprayer*.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas e o título de anticorpos no soro coletado 14 dias após a primeira (A) e a segunda (B) imunizações foi determinado por ELISA. * Indica diferença estatisticamente significativa com o grupo salina (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

Com estes resultados é possível concluir que com a dose de 5 µg de PspA4Pro por via subcutânea foi capaz de induzir anticorpos IgG anti-PspA4Pro de forma mais homogênea somente após a segunda dose. Houve uma tendência de aumento no grupo imunizado com o *microsprayer*, mas novamente a resposta não foi homogênea. Como no caso do insuflador pulmonar, é provável que boa parte da dose tenha ficado dentro do aparelho.

4.3 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS ATRAVÉS DE INSTILAÇÃO UTILIZANDO MICROPIPETA

A técnica de instilação nasal com micropipeta utilizando grande volume (50 µl) em animais anestesiados para imunização pulmonar foi avaliada através da inoculação do corante *Evans Blue*. A Figura 11 mostra que o inóculo é capaz de atingir os pulmões dos camundongos através desta técnica.

Figura 11 - Distribuição pulmonar após instilação de corante *Evans Blue*.

A

B

Pulmões de camundongos foram coletados imediatamente depois de instilação nasal utilizando 50 µl de solução *Evans Blue* 0,05% sob anestesia, como marcador para distribuição pulmonar (A). Os pulmões de animal controle sem instilação também são mostrados (B).

Camundongos BALB/c fêmeas foram então imunizados com uma ressuspensão das NP/NCMPs através de instilação com micropipeta. Foi utilizada a ressuspensão de NP/NCMP vazia ou NP/NCMP PspA4Pro contendo o equivalente 2 µg de PspA4Pro. Como controle, um grupo de animais recebeu salina por via subcutânea, outro grupo recebeu 5 µg de PspA4Pro (proteína purificada apenas) por via subcutânea e um terceiro grupo recebeu 5 µg de PspA4Pro (proteína purificada apenas) por via pulmonar através de instilação com micropipeta. A imunização consistiu em duas doses com um período de 15 dias entre cada dose. Após 14 dias de cada dose foi coletada amostra de sangue dos animais para detecção de anticorpos séricos dos animais.

Como é possível observar na Figura 12, logo após a primeira dose de imunização houve um aumento significativo de anticorpos IgG anti-PspA4Pro nos grupos imunizados com PspA4Pro por via subcutânea e NP/NCMP PspA4Pro em relação ao grupo salina. Após a segunda dose, houve um aumento maior e mais homogêneo nestes dois grupos. Esses dados sugerem que a técnica de imunização pulmonar através de instilação com micropipeta é adequada e que as partículas testadas são imunogênicas, induzindo anticorpos IgG séricos anti-PspA4Pro.

Figura 12 - Título de anticorpos séricos em animais imunizados através de instilação com micropipeta.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas e o título de anticorpos no soro coletado 15 dias após a primeira (A) e a segunda (B) imunizações foi determinado por ELISA. * Indica diferença estatisticamente significativa com o grupo salina (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). Representativo de 3 experimentos independentes.

A diferença de subclasses de IgG foi avaliada com a finalidade de averiguar se a formulação administrada teria a capacidade de direcionar a uma resposta imunológica balanceada, o que favoreceria deposição do complemento, garantindo maior proteção. Foi determinado o título de anticorpos IgG1 anti-PspA4Pro e IgG2a anti-PspA4Pro no soro dos animais imunizados com a PspA4Pro por via subcutânea e com NP/NCMP PspA4Pro no pulmão. A Figura 13 mostra a razão entre o log do título de IgG1 e log do título de IgG2a de cada animal. Nos dois grupos, houve uma maior indução de IgG1, mas não foi observada diferença estatística entre os dois grupos na razão entre IgG1 e IgG2a (teste t não-pareado).

Figura 13 - Avaliação da indução de subclasses de IgG no soro dos animais.

Soro dos camundongos imunizados com as formulações indicadas foi coletado 15 dias após a segunda imunização para determinação do título de IgG 1 anti-PspA4Pro e IgG2a anti-PspA4Pro por ELISA. A razão entre $\log_{10}$ título IgG1 e $\log_{10}$ título IgG2a de cada animal é mostrada.

Foi avaliada ainda a capacidade dos anticorpos induzidos pelas formulações de ligar-se eficientemente à superfície de bactérias intactas de linhagens de diferentes sorotipos e expressando diferentes PspAs. Na Figura 14 é possível observar que os anticorpos séricos induzidos pela imunização com PspA4Pro sc e NP/NCMP PspA4Pro foram capazes de se ligar a PspA dos clados 3 e 5, além do clado homólogo 4, todas da família 2. Porém, os anticorpos induzidos não foram capazes de se ligar a bactérias que expressam PspA dos clados 1 e 2, pertencentes à família 1. Isto sugere que a proteção estimulada contra o pneumococo apesar de não se restringir ao próprio clado, pode estar restrita à família 2 de PspA.

Figura 14 - Ligação de IgG sérico à superfície de pneumococos intactos.

Soro de camundongos imunizados com as formulações indicadas foi coletado 15 dias após a segunda imunização. A mistura dos soros do mesmo grupo foi incubada com pneumococos de linhagem EF3030 (sorotipo 19F, PspA1) (A), D39 (sorotipo 2, PspA2) (B), M10 (sorotipo 11A, PspA3) (C), 3JYP2670 (sorotipo 3, PspA4) (D) e ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5) (E). Após marcação com anti-IgG de camundongo conjugado a FITC, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os gráficos são apresentados como histogramas de intensidade de fluorescência e são representativos de 2 experimentos utilizando soro de imunizações independentes.

Para a análise da resposta local nos pulmões, foi avaliada a presença de anticorpos anti-PspA4Pro no BALF dos camundongos imunizados. Foi observado um aumento significativo

na quantidade de IgG anti-PspA4Pro nos animais imunizados com as NP/NCMP PspA4Pro em relação ao grupo salina (Figura 15A). Entretanto, foi observado apenas um ligeiro aumento de IgA anti-PspA4Pro nos animais imunizados com NP/NCMP PspA4Pro, sem diferença estatística (Figura 15B).

Figura 15 - Detecção de anticorpos no BALF de animais imunizados através de instilação com micropipeta.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas. Anticorpos anti-PspA4Pro IgG (A) e IgA (B) foram detectados no BALF coletado 21 dias após a última imunização. Absorbância obtida na diluição 1:2 do BALF é mostrada. * Indica diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

Para a avaliação da eficácia da vacinação, animais imunizados através de instilação pulmonar foram desafiados com a linhagem ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5). Após 12 horas, os camundongos foram sacrificados para coleta do BALF para determinação da carga bacteriana. Foi observada uma redução na quantidade total de UFC no BALF dos animais imunizados com NP/NCMP PspA4Pro, com diferença estatística com o grupo imunizado com salina, PspA4Pro por via subcutânea ou PspA4Pro por via pulmonar (Figura 16).

Figura 16 - UFC total no BALF de animais imunizados e desafiados com a linhagem ATCC6303.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas e a carga bacteriana no BALF foi determinada 12 horas após o desafio com a linhagem ATCC6303. * Indica diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey). Representativo de 2 experimentos independentes.

A presença de citocinas e quimiocinas no BALF coletado 12 horas após o desafio foi avaliada com kit de detecção baseado em técnica Luminex. Foi avaliada a presença de IFN- γ , IL-1- β , IL-5, IL-6, IL-10, IL17A, KC/CXCL1, MCP-1/CCL2, MIP-2/CXCL2 e TNF- α . Foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas nas citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 17A) e TNF- α (Figura 17B) e nas quimiocinas quimiotáticas para neutrófilos KC/CXCL1 (Figura 17C) e MIP-2/CXCL2 (Figura 17D). Animais imunizados com PspA4Pro sc apresentaram maior concentração de IL-6, TNF- α , KC/CXCL-1 e MIP-2/CXCL-2 quando comparados a animais não-imunizados e não-desafiados (naive), indicando um padrão de resposta à infecção pulmonar bem diferente da imunização com NP/NCMP PspA4Pro. É importante ressaltar que tanto animais imunizados com NP/NCMP vazia e NP/NCMP PspA4Pro apresentaram níveis mais baixos destas citocinas e quimiocinas.

Figura 17 - Concentração de citocinas/quimiocinas no BALF dos animais 12 horas após desafio.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas. Após 21 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com a linhagem ATCC6303. A concentração de IL-6 (A), TNF- α (B), KC/CXCL1 (C) e MIP-2/CXCL2 no BALF coletado 12 horas após o desafio foi determinada por Luminex. * Indica diferença estatisticamente significativa (One-way ANOVA, pós teste de Tukey). Representativo de 2 experimentos independentes.

As células infiltradas no BALF 12 horas após o desafio foram recuperadas e marcadas para imunofenotipagem por citometria de fluxo. A porcentagem de macrófagos alveolares

(AM - F4/80⁺ CD11c⁺ CD11b⁻) (Figura 18A), macrófagos tissulares (TM - F4/80⁺ CD11c⁻ CD11b⁺) (Figura 18B), células B (F4/80⁻ B220⁺) (Figura 18C), células T CD4⁺ (F4/80⁻ CD4⁺) (Figura 18D), células T CD8⁺ (F4/80⁻ CD8⁺) (Figura 18E) e neutrófilos (F4/80⁻ Ly6G⁺) (Figura 18F) foi analisada. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos na porcentagem desses tipos celulares. A maior parte das células recuperadas em todos os grupos foram neutrófilos que infiltraram após o desafio com pneumococo. Foi observado apenas um pequeno aumento na quantidade de AM, TM e células B nos animais imunizados com NP/NCMP PspA4Pro, sem diferença estatística.

Figura 18 - Imunofenotipagem das células presentes no BALF 12 horas após desafio.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas. Após 21 dias da última imunização, os camundongos foram desafiados com cepa ATCC6303. As células recuperadas do BALF coletado 12 horas após o desafio foram marcadas e diferenciadas por citometria de fluxo em: macrófagos alveolares - AM (A), macrófagos tissulares - TM (B), células B (C), células T CD4⁺ (D), células T CD8⁺ (E) e neutrófilos (F).

A sobrevivência final também foi avaliada em camundongos imunizados por instilação pulmonar e desafio com a linhagem ATCC6303. Foi observada proteção parcial induzida pela imunização com NP/NCMP PspA4Pro, com uma taxa de 67% de sobrevivência. O grupo imunizado com PspA4Pro por via subcutânea apresentou uma taxa de sobrevivência de 50% (Tabela 1 e Figura 19).

Tabela 1 - Sobrevivência de camundongos após desafio com o isolado ATCC6303

	Vivos/total	% sobrevivência	<i>P</i> *
Salina sc	0/6	0	-
PspA4Pro sc	3/6	50	0.09
PspA4Pro pulmão	0/6	0	-
NP/NCMP vazia pulmão	0/6	0	-
NP/NCMP PspA4Pro pulmão	4/6	67	0.03

* Teste Exato de Fisher

Figura 19 - Curva de sobrevivência de animais desafiados com a linhagem ATCC6303.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas e desafiados com a linhagem ATCC6303. A sobrevivência foi monitorada por 10 dias. * indica diferença estatística com salina (Teste Log-rank (Mantel-Cox)).

Para confirmar a abrangência da proteção garantida pelas NP/NCMP PspA4Pro, foi realizado um modelo de desafio com a linhagem de pneumococo que expressa PspA de família 1. Após duas doses de imunização, os animais foram desafiados com a linhagem EF3030 (sorotipo 19F, PspA1). Após 24 horas do desafio, os animais foram sacrificados para

coleta do BALF e a carga bacteriana foi determinada. Na Figura 20 é possível observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Figura 20 - UFC total no BALF de animais imunizados e desafiados com linhagem EF3030.

Camundongos foram imunizados com as formulações indicadas e a carga bacteriana no BALF foi determinada 24 horas após o desafio com a linhagem EF3030.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente nos experimentos de imunização, foi utilizado o insuflador pulmonar para inocular as NP/NCMPs numa quantidade equivalente a 0,4µg de PspA4Pro. Como controles, um grupo foi imunizado com 1µg de PspA4Pro e outro com salina, ambos por via subcutânea. Durante o processo de imunização pulmonar dos camundongos, um animal não sobreviveu, indicando tratar-se de um procedimento invasivo. Optamos, portanto, por não inocular uma segunda dose e avaliar resposta de indução de anticorpos no soro após uma única imunização. A baixa concentração de anticorpos pode ser explicada pela administração de uma única dose ser insuficiente para haver uma resposta imune. Observamos ainda que boa parte da dose do pó fica dentro aparelho e não é administrada ao animal, contribuindo para uma baixa reprodutibilidade de dose. De fato, outro grupo já descreveu que mesmo utilizando um volume de ar maior do que aquele sugerido pelo fabricante, boa parte da dose fica retida no aparelho (HOPPENTOCHT et al., 2014). Foi descrito ainda que com a utilização do insuflador pulmonar para administração de pó, a maior parte da dose se deposita na traqueia do animal e, posteriormente, acaba sendo digerida pelo trato gastrointestinal (MOLINA et al., 2016).

A utilização da ressuspensão das NP/NCMPs para administração com o *microsprayer* para imunização dos animais também não se mostrou eficaz, mesmo com duas doses e aumento da concentração das NP/NCMP PspA4Pro para o equivalente a 2 µg de PspA4Pro. Este resultado contrasta com um trabalho que mostrou que uma pequena parte da dose fica retida no aparelho e que o *mycrosprayer* se mostrou mais homogêneo na entrega e dispersão das partículas pelo pulmão de ratos (MOLINA et al., 2016). Entretanto, foi utilizado um volume 20 vezes menor em nossos experimentos, pois a utilização de camundongos para o modelo de imunização limitou a quantidade de líquido a ser administrada no pulmão. Estes dados sugerem que o aparelho não possui uma reprodutibilidade quando se administram doses muito pequenas.

Para melhor controlar a dose administrada, foi utilizada micropipeta para instilar a ressuspensão das NP/NCMPs adsorvidas com PspA4Pro equivalente a 2 µg da proteína. Como controle, foram administrados 5 µg de PspA4Pro por via subcutânea e por via pulmonar. A utilização de concentração diferente da proteína é devida a trabalhos anteriores do grupo que já haviam estabelecido esta dose como usual para imunização subcutânea, enquanto que nosso objetivo ao trabalhar com NPs é reduzir a um mínimo a quantidade de

proteína necessária para uma resposta imunológica ideal. O aumento da viscosidade da ressuspensão com o aumento da quantidade de NP/NCMP PspA4Pro foi outro impedimento para aumento da quantidade de NP/NCMPs administrada. Contudo, foi obtida uma resposta imune muito boa, com níveis de anticorpos sérico semelhantes a vias já tradicionais, como a via subcutânea. Além disso, foi observado um maior nível de IgG1 quando comparado a IgG2a, indicando um direcionamento para uma resposta Th2. Uma melhor produção de anticorpos IgG na mucosa pulmonar pelo grupo imunizado com a NP/NCMP PspA4Pro fortalece este modelo vacinal como uma via de imunização com grande potencial contra patógenos respiratórios. Um trabalho já havia demonstrado que é possível uma indução de anticorpos séricos anti-PspA após administração de micropartículas contendo PspA e administradas por via intramuscular (ANISH et al., 2014). Em outro trabalho, foi demonstrado que uma vacina nasal baseada em nanogéis de CHP contendo PspA foi capaz de induzir uma elevada concentração de IgG sérico nos animais, além de um aumento de IgG e IgA na mucosa nasal e pulmões (KONG et al., 2013). Embora não possamos excluir totalmente a indução de resposta imune em partes da mucosa nasal, a maior parte do antígeno atinge os pulmões ao utilizarmos a técnica de instilação. Essa técnica mimetizaria o uso de uma vacina em pó que poderia ser transportada a temperatura ambiente sem exigências de transporte em cadeia fria e que poderia ser inoculada em humanos através de um nebulizador após ressuspensão em veículo líquido.

Animais imunizados através de instilação nasal com NP/NCMP PspA4Pro foram desafiados com a linhagem de pneumococo ATCC6303 (sorotipo 3, PspA de clado 5, família 2) e o BALF foi coletado após 12 horas para avaliação da carga bacteriana, concentração de citocinas/quimiocinas e infiltrado celular. A escolha do tempo para a coleta de amostras após o desafio deu-se a partir de dados de trabalhos anteriores do nosso grupo, onde foi mostrado que a imunização nasal com uma mistura de PspA recombinante e a vacina celular pertussis é capaz de produzir uma resposta inflamatória precoce e mais controlada nos pulmões frente a um desafio letal. Neste mesmo trabalho foi visto que os animais imunizados apresentavam maior controle na liberação de citocinas inflamatórias e na infiltração celular, com um pico de infiltração de neutrófilos 12 horas após o desafio (LIMA et al., 2012). No trabalho realizado agora, foi possível observar uma significativa redução da quantidade de bactérias no pulmão dos animais imunizados com NP/NCMP PspA4Pro. Além disso, a análise de sobrevivência final mostrou uma proteção parcial induzida por imunização com NP/NCMP PspA4Pro, com 67% de sobrevivência, enquanto que animais imunizados pela tradicional via subcutânea

apresentaram sobrevivência de 50%. Estes dados mostram que a formulação testada para imunização pulmonar é bastante promissora para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra infecções pulmonares por pneumococo. É importante ressaltar que a proteína purificada inoculada nos pulmões não foi capaz de induzir proteção, mostrando que a formulação em NP/NCMP é essencial para a eficácia da vacina.

Foi observada uma tendência de aumento no BALF na porcentagem de macrófagos alveolares e tissulares e a redução na porcentagem de neutrófilos em animais imunizados com NP/NCMP PspA4Pro 12 horas após o desafio com a linhagem ATCC6303, o que pode indicar um controle melhor da infecção nesse momento. A porcentagem de células B também apresentou uma média maior do que os outros grupos, mas também não foi observada diferença estatística. A menor concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e das quimiocinas quimiotáticas para neutrófilos KC/CXCL-1 e MIP-2/CXCL-2 no BALF de animais imunizados com NP/NCMP PspA4Pro corrobora os dados que mostram um melhor controle da infecção 12 horas após o desafio. Esses dados mostram ainda que, embora tanto imunização com PspA4Pro por via subcutânea como com NP/NCMP PspA4Pro nos pulmões induzam proteção parcial contra desafio letal, a cinética do controle da infecção é bastante diferente entre os grupos.

No desafio com a linhagem EF3030 (sorotipo 19F, PspA de clado 1, família 1) não foi observada uma redução na carga bacteriana no BALF de animais imunizados 24 horas após o desafio. Assim, a proteção induzida pela imunização pulmonar com NP/NCMP PspA4Pro parece estar restrita à família 2. Esses resultados corroboram os dados de ligação de anticorpos à superfície de pneumococos intactos, que mostraram ligação de IgG apenas a bactérias expressando PspA de clados 3, 4 e 5, todas da família 2. Em um estudo anterior desenvolvido por nosso grupo, foi demonstrado que a imunização parenteral com PspA4Pro e PspA5 com alum como adjuvante foi capaz de induzir anticorpos com reatividade cruzada alta com diferentes PspAs, o que embasou a utilização de PspA4Pro como uma candidata vacinal com potencial de gerar proteção com grande cobertura de isolados (MORENO et al., 2010). A imunização parenteral com o adjuvante alum leva a níveis bem mais altos de anticorpos quando comparada à imunização pulmonar com NP/NCMP PspA4Pro, o que explicaria a discrepância dos resultados. Trabalho utilizando imunização intranasal com nanogel de CHP contendo PspA recombinante de clado 2 mostrou uma redução significativa da carga bacteriana após 24 horas do desafio com a linhagem Xen10 (derivada de A66.1, sorotipo 3,

PspA2) e uma proteção de 100% em ensaio de sobrevivência. Foi testada apenas a proteção contra bactérias que expressam PspA de mesmo clado, não sendo possível avaliar uma possível cobertura contra linhagens expressando PspA de outros clados. (KONG et al., 2013). Trabalho envolvendo a imunização de macacos rhesus demonstrou que a imunização intranasal com nanogéis de cCHP contendo PspA recombinante de clado 2 foi capaz de induzir altas concentrações de anticorpos séricos, na mucosa nasal e no pulmão. Os anticorpos séricos foram capazes de induzir proteção passiva em camundongos desafiados com as linhagens Xen10 (sorotipo 3, PspA2) e 3JYP2670 (sorotipo 3, PspA4) (FUKUYAMA et al., 2015).

Imunização pulmonar com NP/NCMP PspA4Pro não foi, portanto, capaz de induzir proteção cruzada contra bactérias expressando PspA de outra família. Além da adição de PspA de família 1 na formulação vacinal, NPs baseadas em outros polímeros e a adição de adjuvantes poderiam aumentar a eficácia da vacina e modular a resposta imunológica. Foi demonstrado, por exemplo, que imunização pulmonar com NPs de quitosana foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ , caracterizando uma resposta Th1 (BIVAS-BENITA et al., 2004b). Além disso, o uso de ligante de TLR2 como adjuvante em uma formulação inoculada nos pulmões foi capaz de induzir proteção contra desafio por aerossol com *M. tuberculosis* (TYNE et al., 2013). A inoculação nos pulmões de NPs conjugadas com o antígeno Ag85B com o adjuvante CpG induziu ainda respostas Th1 e Th17 que levaram ao aumento na proteção contra desafio aerossol com *M. tuberculosis* (BALLESTER et al., 2011).

Em conclusão, foi possível estabelecer um protocolo de imunização pulmonar em camundongos com indução de resposta robusta de anticorpos. No entanto, a proteção induzida pela imunização pulmonar com NP/NCMP PspA4Pro contra desafio com pneumococo mostrou-se limitada a uma linhagem expressando PspA da mesma família. Assim, a imunização por via pulmonar com NPs contendo o antígeno PspA é bastante promissora, mas trabalhos futuros precisam ser realizados para melhorar a resposta imunológica e garantir uma proteção com maior cobertura.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISH, C. et al. Influences of process and formulation parameters on powder flow properties and immunogenicity of spray dried polymer particles entrapping recombinant pneumococcal surface protein A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1–2, p. 198-210, 2014.

AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. **J Exp Med**, v. 79, n. 2, p. 137-58, 1944.

AYAME, H.; MORIMOTO, N.; AKIYOSHI, K. Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery. **Bioconjugate chemistry**, v. 19, n. 4, p. 882-890, 2008.

BALLESTER, M. et al. Nanoparticle conjugation and pulmonary delivery enhance the protective efficacy of Ag85B and CpG against tuberculosis. **Vaccine**, v. 29, n. 40, p. 6959-66, 2011.

BARNETT, T. C. et al. Host–pathogen interaction during bacterial vaccination. **Current opinion in immunology**, v. 36, p. 1-7, 2015.

BAROCCHI, M. et al. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 8, p. 2857-2862, 2006.

BECHINI, A.; BOCCALINI, S.; BONANNI, P. Immunization with the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine: Impact evaluation, continuing surveillance and future perspectives. **Vaccine**, v. 27, n. 25, p. 3285-3290, 2009.

BIVAS-BENITA, M. et al. Pulmonary delivery of DNA encoding Mycobacterium tuberculosis latency antigen Rv1733c associated to PLGA–PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 30, p. 4010-4017, 2009.

BIVAS-BENITA, M. et al. PLGA–PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 1-6, 2004a.

BIVAS-BENITA, M. et al. Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine**, v. 22, n. 13–14, p. 1609-1615, 2004b.

BLANK, F.; STUMBLES, P.; VON GARNIER, C. Opportunities and challenges of the pulmonary route for vaccination. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 8, n. 5, p. 547-63, 2011.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 144-54, 2004a.

BOGAERT, D. et al. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, n. 17, p. 2209-2220, 2004b.

BRANDILEONE, M. C. et al. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J Infect Dis**, v. 187, n. 8, p. 1206-12, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde - Brasil. **Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. Brasília, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis - Brasil. **Nota Informativa nº 149**. Brasília, 2015.

BRILES, D. E. et al. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 68, n. 2, p. 796-800, 2000.

BRILES, D. E. et al. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 19 Suppl 1, p. S87-95, 2001.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical microbiology**. 21 edition. United States of America: Appleton and Lange, 1998.

BRUYN, G. W.; VAN FURTH, R. Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 10, n. 11, p. 897-910, 1991.

BRYANT, K. A. et al. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Pediatrics**, v. 125, n. 5, p. 866-75, 2010.

BURNAUGH, A. M.; FRANTZ, L. J.; KING, S. J. Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 221-230, 2008.

CARRILLO-CONDE, B. et al. Encapsulation into amphiphilic polyanhydride microparticles stabilizes *Yersinia pestis* antigens. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 8, p. 3110-3119, 2010.

CDC. **Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)**. MMWR 1997. Atlanta, 1997.

COONROD, J. D.; VARBLE, R.; YONEDA, K. Mechanism of killing of pneumococci by lysozyme. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 3, p. 527-532, 1991.

CRAIN, M. J. et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 58, n. 10, p. 3293-9, 1990.

CROUCHER, N. J. et al. Rapid Pneumococcal Evolution in Response to Clinical Interventions. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 430-434, 2011.

CRYAN, S. A. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs. **AAPS J**, v. 7, n. 1, p. E20-41, 2005.

DANHIER, F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 2, p. 505-522, 2012.

DARRIEUX, M. et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 3, p. 273-8, 2008.

DAVE, S. et al. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3435-7, 2001.

DENOEL, P. et al. A protein-based pneumococcal vaccine protects rhesus macaques from pneumonia after experimental infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, 2011.

DIEUDONNE-VATRAN, A. et al. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. **J Immunol**, v. 182, n. 12, p. 7865-77, 2009.

DOCKRELL, D. H.; WHYTE, M. K.; MITCHELL, T. J. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. **CHEST Journal**, v. 142, n. 2, p. 482-491, 2012.

DONATI, C. et al. Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. **Genome Biology**, v. 11, n. 10, p. R107, 2010.

DOS SANTOS, S. R. 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**, v. 31, n. 51, p. 6150-6154, 2013.

FASCHING, C. E. et al. Impact of the molecular form of immunoglobulin A on functional activity in defense against *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1801-1810, 2007.

FELDMAN, C. et al. The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. **Respiratory medicine**, v. 96, n. 8, p. 580-585, 2002.

FELDMAN, C. et al. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. **Microbial pathogenesis**, v. 9, n. 4, p. 275-284, 1990.

FIGUEIREDO, D. B. et al. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-13, 2016.

FRANCO, C. M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n. 1, p. 77-9, 2010.

FU, J. et al. New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection. **Biomaterials**, v. 23, n. 22, p. 4425-4433, 2002.

FUKUYAMA, Y. et al. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. **Mucosal Immunology**, v. 8, p. 1144, 2015.

GBD 2015 LRI Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1133-1161, 2017.

GENO, K. A. et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 871-899, 2015.

HAUGHNEY, S. L. et al. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. **Acta Biomater**, v. 9, n. 9, p. 8262-71, 2013.

HICKS, L. A. et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J Infect Dis**, v. 196, n. 9, p. 1346-54, 2007.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5889-900, 2000.

HOPPENTOCHT, M. et al. In vitro evaluation of the DP-4M PennCentury™ insufflator. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 153-159, 2014.

HSIEH, Y.-C. et al. Expansion and Evolution of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A ST320 Clone as Compared to Its Ancestral Clone, Taiwan19F-14 (ST236). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 2, p. 203-210, 2013.

HUSS, A. et al. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 180, n. 1, p. 48-58, 2009.

JIANG, W.; SCHWENDEMAN, S. P. Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly (D, L-lactide) and poly (ethylene glycol) microsphere blends. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 6, p. 878-885, 2001.

KAPLAN, S. L. et al. Six year multicenter surveillance of invasive pneumococcal infections in children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 21, n. 2, p. 141-147, 2002.

KONG, I. G. et al. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 81, n. 5, p. 1625-1634, 2013.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUNDA, N. K. et al. Dry powder pulmonary delivery of cationic PGA-co-PDL nanoparticles with surface adsorbed model protein. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1, p. 213-222, 2015a.

KUNDA, N. K. et al. Pulmonary Dry Powder Vaccine of Pneumococcal Antigen Loaded Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 2015b.

KUNDA, N. K. et al. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. **Pharm Res**, v. 30, n. 2, p. 325-41, 2013.

LASSMANN-VAGUE, V.; RACCAH, D. Alternatives routes of insulin delivery. **Diabetes & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 513-522, 2006.

LIMA, F. A. 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**, v. 19, n. 9, p. 1382-92, 2012.

LOO, J. D. et al. Systematic review of the indirect effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on pneumococcal disease and colonization. **Pediatr Infect Dis J**, v. 33 Suppl 2, p. S161-71, 2014.

LUCERO-ACUÑA, A. et al. Nanoparticle delivery of an AKT/PDK1 inhibitor improves the therapeutic effect in pancreatic cancer. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 5653, 2014.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.

MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 18, p. 3303-26, 2013.

MOFFITT, K. L.; MALLEY, R. Next generation pneumococcal vaccines. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 3, p. 407-413, 2011.

MOLINA, R. M. et al. Pulmonary distribution of nanoceria: comparison of intratracheal, microspray instillation and dry powder insufflation. **Inhalation Toxicology**, v. 28, n. 12, p. 550-560, 2016.

MOOK-KANAMORI, B. B. et al. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 557-591, 2011.

MOREIRA, M. et al. Impact of the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine in the Brazilian routine childhood national immunization program. **Vaccine**, v. 34, n. 25, p. 2766-2778, 2016.

MORENO, A. T. 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**, v. 17, n. 3, p. 439-46, 2010.

MUNDARGI, R. C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **J Control Release**, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008.

NELSON, A. L. et al. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. **Infection and immunity**, v. 75, n. 1, p. 83-90, 2007.

NOVAES, H. M.; SARTORI, A. M.; SOAREZ, P. C. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004 - 2006. **Rev Saude Publica**, 2011.

O'BRIEN, K. L. et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, 2009.

OGUNNIYI, A. D. et al. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 3028-33, 2000.

OGUNNIYI, A. D. et al. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 75, n. 1, p. 350-7, 2007.

OGUNNIYI, A. D.; PATON, J. C. Vaccine Potential of Pneumococcal Proteins. In: Jeremy Brown, *et al* (Ed.). **Streptococcus Pneumoniae**. Amsterdam: Academic Press, 2015. p.59-78. ISBN 978-0-12-410530-0.

PELTON, S. I. et al. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **Vaccine**, v. 21, n. 15, p. 1562-71, 2003.

PETERSEN, L. K. et al. Amphiphilic Polyanhydride Nanoparticles Stabilize *Bacillus anthracis* Protective Antigen. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 874-882, 2012.

PETERSEN, L. K. et al. The simultaneous effect of polymer chemistry and device geometry on the in vitro activation of murine dendritic cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 28, p. 5131-5142, 2009.

PRYMULA, R.; SCHUERMAN, L. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix. **Expert Rev Vaccines**, v. 8, n. 11, p. 1479-500, 2009.

RAMIREZ, M. et al. Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* In: Jeremy Brown, *et al* (Ed.). **Streptococcus Pneumoniae**. Amsterdam: Academic Press, 2015. p.3-19. ISBN 978-0-12-410530-0.

REN, B. et al. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 114-22, 2004.

SABHARWAL, V. et al. Role of complement in host defense against pneumococcal otitis media. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 1121-1127, 2009.

SARTORI, A. M.; DE SOAREZ, P. C.; NOVAES, H. M. Cost-effectiveness of introducing the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine into the universal immunisation of infants in Brazil. **J Epidemiol Community Health**, 2010.

SHAPER, M. et al. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5031-40, 2004.

TAWFEEK, H. M. et al. Dry powder inhalation of macromolecules using novel PEG-co-polyester microparticle carriers. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1, p. 611-619, 2013.

TAWFEEK, H. M. et al. Poly(glycerol adipate-co-omega-pentadecalactone) spray-dried microparticles as sustained release carriers for pulmonary delivery. **Pharm Res**, v. 28, n. 9, p. 2086-97, 2011.

TETTELIN, H. et al. Genomics, Genetic Variation, and Regions of Differences. In: Jeremy Brown, *et al* (Ed.). **Streptococcus Pneumoniae**. Amsterdam: Academic Press, 2015. p.81-107. ISBN 978-0-12-410530-0.

TETTELIN, H. et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Science**, v. 293, n. 5529, p. 498, 2001.

TONNIS, W. F. et al. Devices and formulations for pulmonary vaccination. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 10, n. 10, p. 1383-97, 2013.

TORRES, M. P. et al. Polyanhydride microparticles enhance dendritic cell antigen presentation and activation. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2857-2864, 2011.

TU, A. H. et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4720-4, 1999.

TYNE, A. S. et al. TLR2-targeted secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* are protective as powdered pulmonary vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 40, p. 4322-9, 2013.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **The Lancet**, v. 374, n. 9700, p. 1543-1556, 2009.

VASIR, J. K.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 8, p. 718-728, 2007.

WEISER, J. N. et al. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 4215-4220, 2003.

WEYCKER, D. et al. Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. **Vaccine**, v. 28, n. 31, p. 4955-4960, 2010.

WHITNEY, C. G. et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N Engl J Med**, v. 348, n. 18, p. 1737-46, 2003.

WHO. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 82, n. 12, p. 93-104, 2007.

_____. Pneumococcal vaccines WHO position paper - 2012. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 87, n. 14, p. 129-144, 2012.

_____. **Pneumonia**. Nova York, 2016. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>>. Acesso em: 04 abr. 2017.

_____. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Geneva, 2017. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

WU, D. B. et al. Choosing between 7-, 10-and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines in childhood: A review of economic evaluations (2006–2014). **Vaccine**, v. 33, n. 14, p. 1633-1658, 2015.

YOTHER, J.; BRILES, D. E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. **J Bacteriol**, v. 174, n. 2, p. 601-9, 1992.

YOTHER, J.; WHITE, J. M. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. **J Bacteriol**, v. 176, n. 10, p. 2976-85, 1994.

YUSTE, J. et al. The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. **Infect Immun**, v. 78, n. 1, p. 283-92, 2010.

ZHANG, H. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. In: Gerard G. M. D'souza (Ed.). **Liposomes: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p.17-22. ISBN 978-1-4939-6591-5.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO

RESEARCH ARTICLE

Mucosal immunization with PspA (Pneumococcal surface protein A)-adsorbed nanoparticles targeting the lungs for protection against pneumococcal infection

Tasson C. Rodrigues¹, Maria Leonor S. Oliveira¹, Alessandra Soares-Schanoski¹, Stefanni L. Chavez-Rico¹, Douglas B. Figueiredo², Viviane M. Gonçalves², Daniela M. Ferreira³, Nitesh K. Kunda^{4a}, Imran Y. Saleem⁴, Eliane N. Miyaji^{1*}

1 Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, **2** Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, **3** Respiratory Infection Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom, **4** Formulation and Drug Delivery Research, School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, United Kingdom

✉ Current address: Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of New Mexico, Albuquerque, United States of America

* eliane.miyaji@butantan.gov.br

OPEN ACCESS

Citation: Rodrigues TC, Oliveira MLS, Soares-Schanoski A, Chavez-Rico SL, Figueiredo DB, Gonçalves VM, et al. (2018) Mucosal immunization with PspA (Pneumococcal surface protein A)-adsorbed nanoparticles targeting the lungs for protection against pneumococcal infection. PLoS ONE 13(1): e0191692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692>

Editor: Daniela Flavia Hozbor, Universidad Nacional de la Plata, ARGENTINA

Received: November 30, 2017

Accepted: January 9, 2018

Published: January 23, 2018

Copyright: © 2018 Rodrigues et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (www.fapesp.br) (VMG grant 2015/06255-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (www.cnpq.br) (ENM grant 303198/2014-1). TCR received an undergraduate

Abstract

Burden of pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* remains high despite the availability of conjugate vaccines. Mucosal immunization targeting the lungs is an attractive alternative for the induction of local immune responses to improve protection against pneumonia. Our group had previously described the development of poly(glycerol adipate-co- ω -pentadecalactone) (PGA-co-PDL) polymeric nanoparticles (NPs) adsorbed with Pneumococcal surface protein A from clade 4 (PspA4Pro) within L-leucine microcarriers (nanocomposite microparticles—NCMPs) for mucosal delivery targeting the lungs (NP/NCMP PspA4Pro). NP/NCMP PspA4Pro was now used for immunization of mice. Inoculation of this formulation induced anti-PspA4Pro IgG antibodies in serum and lungs. Analysis of binding of serum IgG to intact bacteria showed efficient binding to bacteria expressing PspA from clades 3, 4 and 5 (family 2), but no binding to bacteria expressing PspA from clades 1 and 2 (family 1) was observed. Both mucosal immunization with NP/NCMP PspA4Pro and subcutaneous injection of the protein elicited partial protection against intranasal lethal pneumococcal challenge with a serotype 3 strain expressing PspA from clade 5 (PspA5). Although similar survival levels were observed for mucosal immunization with NP/NCMP PspA4Pro and subcutaneous immunization with purified protein, NP/NCMP PspA4Pro induced earlier control of the infection. Conversely, neither immunization with NP/NCMP PspA4Pro nor subcutaneous immunization with purified protein reduced bacterial burden in the lungs after challenge with a serotype 19F strain expressing PspA from clade 1 (PspA1). Mucosal immunization with NP/NCMP PspA4Pro targeting the lungs is thus able to induce local and systemic antibodies, conferring protection only against a strain expressing PspA from the homologous family 2.

studentship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2014/25436-9) and a MSc studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (www.capes.gov.br). SLC received a studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. DBF received a PhD studentship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (140573/2015-1). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Despite the availability of vaccines, *Streptococcus pneumoniae* remains an important cause of community acquired pneumonia and invasive pneumococcal disease (IPD). Polysaccharide conjugated vaccines confer good levels of protection against IPD caused by vaccine serotypes, but studies evaluating efficacy against pneumonia show varying results [1, 2]. It has been estimated that 2.7 million deaths occurred globally in 2015 due to lower respiratory infections, of which 704,000 occurred among children younger than 5 years. Pneumococcal pneumonia accounted for 55.8% of deaths due to lower respiratory infection in children younger than 5 years [3], which clearly shows that new vaccine strategies to control the burden of pneumococcal pneumonia are needed. The use of vaccine formulations that induce local immune responses in the lungs could be an interesting approach. Interest in lung vaccination has recently increased for prevention and treatment of respiratory diseases such as tuberculosis and influenza [4–6]. Besides the induction of local immune responses, vaccines targeting the lungs would have other advantages over parenteral injection, such as no risks of needle injuries and removal of cold chain requirements in the case of dry powder formulations [7].

Protein antigens can be an interesting alternative for pneumococcal polysaccharide vaccines and a promising candidate is Pneumococcal surface protein A (PspA). PspA is an important virulence factor and parenteral immunization with this antigen has been shown to be protective in pneumococcal challenge models of lethal infection and pneumonia [8–10]. PspA shows variability in different isolates and sequence-based classification divides PspA variants into three families, that are further subdivided into six clades: family 1 (clades 1 and 2), family 2 (clades 3, 4 and 5) and family 3 (clade 6) [11]. To achieve complete coverage, it has been suggested that a PspA-based vaccine should contain at least one PspA from each of the two major families (families 1 and 2) [11]. Our group has previously shown that parenteral immunization of mice with a recombinant PspA from clade 4 (PspA4, family 2) or from clade 5 (PspA5, family 2) using alum as adjuvant induces protection against lethal pneumococcal challenge with strains expressing PspA from families 1 and 2 [12]. Intranasal vaccination with PspA against pneumococcal infection has also been tested in animal models. Intranasal immunization of mice with native PspA using cholera toxin B-subunit or a non-toxic cholera toxin mutant as adjuvant was shown to elicit humoral responses in serum and saliva and protection against lethal challenge with a serotype 3 strain [13, 14]. More recently, a nanogel containing recombinant PspA was shown to protect mice against a lethal pneumococcal challenge after intranasal immunization of mice [15]. Nasal delivery of an optimized nanogel containing recombinant PspA to rhesus macaques was later shown to induce IgG in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), IgA in nasal wash and a Th2/Th17 cytokine response [16].

Our group has recently described the development of a dry powder formulation containing recombinant PspA from clade 4 (PspA4Pro) adsorbed onto the surface of poly(glycerol adipate-co- ω -pentadecalactone) (PGA-co-PDL) polymeric nanoparticles (NPs) encapsulated in L-leucine microparticles. The aim was to use these dry powder nanocomposite microparticles (NCMPs) as a pulmonary vaccine that can be delivered to the lungs via an inhaler or nebulizer to humans. The NP/NCMPs containing PspA4Pro (NP/NCMP PspA4Pro) were shown to be $\sim 2\ \mu\text{m}$ particles and *in vitro* lung deposition data suggested delivery to the bronchial-alveolar region of the lungs. Furthermore, *in vitro* internalization by DCs confirmed suitability of the size of the produced NPs ($\sim 300\ \text{nm}$) for vaccine delivery [17]. Nano- and microparticles containing recombinant PspA have been previously tested in mice using parenteral immunization. Spray-dried polylactide (PLA) microparticles entrapping recombinant PspA were tested as intramuscular immunization admixed with alum, eliciting a robust IgG response in mice [18]. Polyanhydride nanoparticles were also used to encapsulate recombinant PspA and

subcutaneous immunization with these particles elicited an antibody response with high titer and avidity [19]. This work now describes the immune responses and protection potential of mucosal immunization with NP/NCMP PspA4Pro based on PGA-co-PDL targeting the lungs of mice. To our knowledge, this is the first study targeting the lungs for immunization with nanoparticles containing a protein antigen against pneumococcal infection.

Materials and methods

Ethics statement

This study was performed according to the guidelines outlined by the Brazilian National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). Experimental protocols were approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) under protocol number 1160/13. Five to six animals were housed per cage inside a ventilated cabinet under controlled temperature and light cycle (12/12 hours, light/dark cycle) with daily monitoring in a BSL2 animal facility. Food and water were given ad libitum. Monitoring and manipulation was done by trained personnel.

Bacterial strains and growth conditions

S. pneumoniae strains were grown in Todd-Hewitt broth (Difco) supplemented with 0.5% yeast extract (THY) at 37°C without shaking. Bacteria were always plated in blood agar and grown overnight at 37°C before culture in THY. Stocks were maintained at –80°C in THY containing 20% glycerol.

Preparation of NP/NCMPs adsorbed with PspA4Pro

The expression and purification of PspA4Pro (PspA clade 4, encompassing mature N-terminal region till proline-rich region) was described previously [20]. Briefly, *Escherichia coli* BL21 DE3 transformed with pET-pspA4Pro was used to express the protein. Purification was performed through double ion exchange chromatography. With this method, PspA4Pro was recovered with a high purity (greater than 97%) and low endotoxin concentration (0.07 EU/μg PspA4Pro). PGA-co-PDL NPs were adsorbed with PspA4Pro and formulated as NCMPs with L-leucine through spray-drying as previously described [17].

Immunization of mice with NP/NCMPs

Five- to seven-week-old female specific-pathogen-free (SPF) BALB/c mice (5–6 animals per group) were obtained from the Medical School of the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). Mucosal immunization targeting the lungs was conducted after anesthesia of mice by intraperitoneal (ip) inoculation of a xylazine/ketamine solution (20 mg/Kg of xylazine and 100 mg/Kg of ketamine). For delivery of NP/NCMPs (NP/NCMP empty or NP/NCMP PspA4Pro—containing 2 μg PspA4Pro), formulations were resuspended in saline (50 μl/dose) immediately before instillation into one nostril using a micropipette. Nasal instillation of this large volume under anesthesia ensures delivery of the majority of the inoculum to the lungs of mice (S1 Fig). Animals injected with saline or purified PspA4Pro subcutaneously (sc) (5 μg in 100 μl) and with purified PspA4Pro instilled into the lungs (5 μg in 50 μl, instillation into one nostril under anesthesia) were used as controls. Mice were immunized twice with a 14-days interval. Duration of experiments was 28 to 45 days, depending on whether animals were challenged or not.

Collection of serum and BALF

Serum was collected 14 days after each dose for the evaluation of IgG levels. For collection of BALF, mice were euthanized through the ip route with a lethal dose of a xylazine/ketamine solution (60 mg/Kg of xylazine and 300 mg/Kg of ketamine). BALF was collected, as previously described [21], for the evaluation of IgG, IgA, cytokine/chemokine content and immunophenotyping of cells.

Measurement of antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA was carried out as described previously [12] in plates coated with 5 µg/ml PspA4Pro. For the detection of serum antibodies, goat anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) was used as secondary antibody. For IgG isotyping, goat anti-mouse IgG1, goat anti-mouse IgG2a and rabbit anti-goat IgG conjugated with horseradish peroxidase (Southern Biotech) were used. The titer was defined as the reciprocal of the highest dilution with an $A_{492} \geq 0.1$. For the detection of antibodies in BALF, goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (AP), goat anti-mouse IgA and rabbit anti-goat IgG conjugated with AP (Southern Biotech) were used and A_{405} was measured. Background value of each plate (0.040 to 0.045) was subtracted from the actual absorbance obtained for each sample.

Binding of antibodies to intact bacteria

Antibody binding was performed as previously described [22]. Strains EF3030 (serotype 19F, PspA1), D39 (serotype 2, PspA2), M10 (serotype 11A, PspA3), 3JYP2670 (serotype 3, PspA4) and ATCC6303 (serotype 3, PspA5) [9, 12] were plated on blood agar for overnight growth, then cultured in THY to OD_{600 nm} 0.4–0.5 ($\sim 10^8$ CFU/ml) and harvested by centrifugation. Bacteria were washed, suspended in PBS and incubated with 1% of pooled sera for 30 min at 37°C. Samples were washed once with PBS before incubation with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) for 30 min on ice. Samples were fixed with 2% formaldehyde after two washing steps and stored at 4°C. Flow cytometry analysis was conducted using FACSCanto (BD Biosciences), and 10,000 gated events were recorded.

Pneumococcal challenge

Twenty one days after the last immunization, mice were anesthetized through the ip route with a xylazine/ketamine solution (20 mg/Kg of xylazine and 100 mg/Kg of ketamine) and challenged with 5×10^4 CFU of strain ATCC6303 or 10^7 CFU of strain EF3030. A volume of 50 µl was inoculated into one nostril. Mice were euthanized 12 or 24 hours later to collect BALF. Pneumococcal load was determined by plating serial dilutions of the samples on blood agar with 4 µg/ml gentamicin. For the analysis of overall survival, mice were evaluated for 10 days after challenge. Animals were monitored twice daily after challenge and lethargic animals with reduced ability to move were euthanized immediately through the ip route with a lethal dose of a xylazine/ketamine solution (60 mg/Kg of xylazine and 300 mg/Kg of ketamine). No animals died before meeting criteria for euthanasia.

Measurement of cytokine/chemokine in BALF

A Luminex-based assay (Milliplex Map Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Merck Millipore) was used to measure IFN- γ , IL-1- β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, KC/CXCL1, MCP-1/CCL2, MIP-2/CXCL2 and TNF- α in BALF samples. Results were acquired using Magpix (Merck Millipore) with Xponent (Luminex software) and analyzed with Milliplex Analyst

(Merck Millipore), based on standard curves plotted through a 5-parameter logistic curve setting.

Immunophenotyping of BALF cells

Cells recovered from BALF samples were immunophenotyped using anti-F4/80 PE-Cy7, anti-CD11c APC, anti-CD11b BB515, anti-CD4 APC-Cy7, anti-CD8 PerCP-Cy5.5, anti-B220 PE, anti-Ly6G BV421 (BD Biosciences) using FACSCanto II (BD Biosciences). The cytometer was set up using CompBeads (BD Biosciences) according to standard procedures. 30,000 events were recorded, excluding the low complexity events, through the FSC and SSC parameters, and dead cells by using the FVS-510 marker (BD Biosciences). The analysis was performed using FlowJo V10 software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.02 (GraphPad). Differences between groups were analyzed using One-way Analysis of Variance (ANOVA) with Tukey's Multicomparison Test, Unpaired t-test or Paired t-test. Analysis of survival was performed using Fisher Exact Test and Log-rank (Mantel-Cox) test. * and #— $p \leq 0.05$, ** and ##— $p \leq 0.01$, ***— $p \leq 0.001$.

Results

Induction of anti-PspA4Pro antibodies by immunization with NP/NCMPs

Mucosal immunization targeting the lungs was done with the resuspension of NP/NCMP PspA4Pro. Purified protein was used as control in parenteral (PspA4Pro sc) and mucosal (PspA4Pro lungs) immunizations. Mice received two doses of the formulations with a 15-day interval and anti-PspA4Pro IgG titers were measured in the serum obtained from blood samples collected 14 days after each dose. We observed a significant increase of IgG titers in serum of mice immunized with PspA4Pro sc and NP/NCMP PspA4Pro compared with saline after the first (Fig 1A) and second doses (Fig 1B). Negligible antibody response was observed after mucosal immunization with the purified protein in the group PspA4Pro lungs. Immunization with NP/NCMP PspA4Pro elicited lower responses than PspA4Pro sc after the first dose, but a robust antibody response was observed after the second dose, with titers higher than those elicited by PspA4Pro sc (Fig 1B). Both PspA4Pro sc and NP/NCMP PspA4Pro elicited significantly higher titers of anti-PspA4Pro IgG1 compared with IgG2a ($p \leq 0.01$; Paired t-test), indicating a bias toward a Th2 response. No differences in IgG1/IgG2a ratios were observed between animals immunized with PspA4Pro sc and NP/NCMP PspA4Pro (Fig 1C). Twenty one days after the second dose, BALF was collected and anti-PspA4Pro IgG and IgA were measured. NP/NCMP PspA4Pro showed significantly higher levels of IgG in BALF than saline. Moreover, PspA4Pro sc induced a slight but not significant increase in IgG titers (Fig 2A), whereas IgA levels were not increased in any of the groups (Fig 2B).

Binding of anti-PspA4Pro IgG to pneumococcal strains expressing different PspAs

Binding of serum IgG antibodies to pneumococci from different serotypes and expressing PspA from clades 1 to 5 was analyzed by flow cytometry. Antibodies elicited by immunization with PspA4Pro sc and NP/NCMP PspA4Pro did not bind to strains expressing PspA from family 1, EF3030 (serotype 19F, PspA1) or D39 (serotype 2, PspA2). On the other hand, binding to strains expressing PspA from family 2 was observed, with binding to M10 (serotype

Fig 1. Induction of serum anti-PspA4Pro IgG antibodies by mucosal immunization targeting the lungs. The induction of anti-PspA4Pro IgG antibodies in sera from mice inoculated with the indicated formulations was determined by ELISA. Mice were inoculated with 1 (A) or 2 (B and C) doses of the formulations. Control mice were inoculated sc with saline or PspA4Pro. Log₁₀ anti-PspA4Pro IgG titers (A and B) and log₁₀ anti-PspA4Pro IgG1 titer/log₁₀ anti-PspA4Pro IgG2a titer ratios (C) are shown. * indicates statistically significant difference with saline and # indicates statistically significant difference with PspA4Pro sc (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test for A and B; Unpaired t-test for C). Symbols represent each individual. Means ± standard errors are shown. Representative of at least two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g001>

11A, PspA3) and high binding to 3JYP2670 (serotype 3, PspA4) and ATCC6303 (serotype 3, PspA5) (Fig 3, S1 Table).

Pneumococcal lethal challenge with strain ATCC6303 (serotype 3, PspA5)

Efficacy of lung immunization with NP/NCMP PspA4Pro was then tested against a lethal challenge with pneumococcal strain ATCC6303 delivered to the lungs 21 days after the second dose. Partial protection was observed for mice immunized with PspA4Pro sc (50%–3 out of 6, $p = 0.09$) and NP/NCMP PspA4Pro (67%–4 out of 6, $p = 0.03$) (Table 1, Fig 4).

Bacterial load in BALF collected 12 hours after challenge was also analyzed. Only animals immunized with NP/NCMP PspA4Pro had significant lower pneumococcal load compared with saline. Approximately 1 log reduction on CFU was observed (Fig 5). Thus, although overall survival after 10 days was similar in animals immunized with PspA4Pro sc and NP/NCMP PspA4Pro, the group inoculated with NP/NCMP PspA4Pro showed an earlier response in controlling the infection at 12 hours after challenge. Some reduction in the group inoculated with NP/NCMP empty was also observed at this early phase, indicating the influence of non-specific responses at this time of infection.

Cytokine/chemokine content in BALF was also analyzed. Levels of IFN- γ , IL-1- β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, KC/CXCL1, MCP-1/CCL-2, MIP-2/CXCL2 and TNF- α were measured. We observed differences between groups only for the proinflammatory cytokines IL-6 (Fig 6A) and TNF- α (Fig 6B) and for the neutrophil chemoattractants KC/CXCL1 (Fig 6C) and MIP-2/CXCL2 (Fig 6D). Overall, higher levels of these cytokines and chemokines were observed for PspA4Pro sc compared to naive mice (not immunized nor challenged). These results are in accordance with protection elicited by immunization with PspA4Pro sc and NP/NCMP PspA4Pro progressing differently, with higher inflammatory responses and pneumococcal load in the PspA4Pro sc group after 12 hours.

Fig 2. Induction of anti-PspA4Pro antibodies in BALF by mucosal immunization targeting the lungs. The induction of anti-PspA4Pro IgG (A) and IgA (B) antibodies in BALF from mice inoculated with the indicated formulations was determined by ELISA. Mice were inoculated with 2 doses of the formulations. Control mice were inoculated sc with saline or PspA4Pro. $A_{405\text{nm}}$ of samples diluted 1:2 is shown. * indicates statistically significant difference with saline (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test). Symbols represent each individual. Means $\pm$ standard errors are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g002>

Immunophenotyping of the cells infiltrated in BALF 12 hours after challenge was also performed (Fig 7). Percentage of alveolar macrophages (AM—F4/80⁺ CD11c⁺ CD11b⁺), exudate macrophages (EM—F4/80⁺ CD11c⁺ CD11b⁺), B cells (F4/80⁺ B220⁺), CD4⁺ T cells (F4/80⁺ CD4⁺), CD8⁺ T cells (F4/80⁺ CD8⁺) and neutrophils (F4/80⁺ Ly6G⁺) were analyzed, but no statistically significant differences were observed. In all groups, the majority of the cells were neutrophils that infiltrated after the challenge. A trend toward higher percentage of AMs, EMs and B cells and lower percentage of neutrophils was observed in animals immunized with NP/NCMP PspA4Pro.

Pneumococcal non-lethal challenge with strain EF3030 (serotype 19F, PspA1)

Efficacy of immunization with NP/NCMP PspA4Pro was then tested against lung challenge with pneumococcal strain EF3030, which does not lead to the death of BALB/c mice. Bacterial load in BALF was assessed 24 hours after challenge and no differences were observed between groups (Fig 8).

Discussion

We have evaluated a dry powder formulation composed of NCMPs containing PGA-co-PDL NPs adsorbed with PspA4Pro for mucosal vaccination targeting the lungs against pneumococcal

Fig 3. Binding of serum IgG to intact pneumococci. Sera from mice immunized with two doses of the indicated formulations were tested for the ability to bind to pneumococcal strains expressing PspA from clades 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) and 5 (E). Results are shown as fluorescence intensity histograms and are representative of two experiments using sera from independent immunizations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g003>

infection. A dry-powder vaccine for humans could be transported without cold-chain requirements and could then be delivered to the lungs using an inhaler as powder or using a nebulizer after resuspension in liquid vehicle.

Table 1. Survival after lethal challenge with ATCC6303.

	alive/total	% survival	P *
1- saline sc	0/6	0	-
2- PspA4Pro sc	3/6	50	0.09
3- PspA4Pro lungs	0/6	0	-
4- NP/NCMP empty lungs	0/6	0	-
5- NP/NCMP PspA4Pro lungs	4/6	67	0.03

* Fisher exact test

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.t001>

Fig 4. Survival curve of mice challenged with ATCC6303. Mice were immunized with the indicated formulations and challenged with pneumococcal strain ATCC6303. Survival was monitored for 10 days. * indicates statistically significant difference with saline (Log-rank (Mantel-Cox) test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g004>

Recently, the importance of regionally compartmentalized resident memory CD4⁺ T cells was described in the naturally acquired protection against pneumococcal pneumonia, with superior local tissue protection compared to systemic or central memory responses [23]. Furthermore, previous sub-lethal lung infection of mice with pneumococci was shown to provide better protection against pneumococcal pneumonia by heterologous strains when compared to colonization, emphasizing the importance of local lung immune responses in the protection against pneumonia [24].

Pulmonary delivery of the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine with a nebulizer has been previously tested in chronic obstructive pulmonary disease patients and healthy adults and lower responses were observed compared to intramuscular injection [25, 26]. Another study using a similar immunization strategy reported no induction of IgG or IgA antibodies in serum or BALF [27]. The 23-valent vaccine however has non-conjugated polysaccharides and induces T-independent responses that tend to be weaker than immune responses to protein antigens.

For experimental mucosal delivery of NP/NCMP PspA4Pro targeting the lungs of mice, the resuspension of the formulation was inoculated through instillation with a large volume. Nasal administration with small volumes (~10 µl) is routinely used in our laboratory for immunization targeting nasal tissue in mice, whereas larger volumes (40–50 µl) ensure delivery to the lungs. Although we cannot rule out the induction of part of the immune responses in the nasal tissue, the largest amount of antigen is delivered to the lungs using this procedure. Furthermore, the use of nebulizers in humans for lung immunization would also deliver the largest amount of the vaccine to the lungs, but some of the inoculum would also be delivered to the nasopharynx and/or oropharynx, similarly to our experimental procedure in mice. High anti-PspA4Pro IgG titers were detected in serum after two doses of NP/NCMP PspA4Pro targeting the lungs. Titers were higher than sc inoculation of purified PspA4Pro and, importantly, instillation of purified PspA4Pro induced a negligible antibody response, indicating that formulation of the protein in NPs is essential for the immune response. Anti-PspA4Pro IgG, but not IgA, was detected in BALF of mice immunized with NP/NCMP PspA4Pro.

Fig 5. Pneumococcal load in BALF collected 12 hours after lethal challenge with ATCC6303. Mice were immunized with 2 doses of the indicated formulations and challenged with pneumococcal strain ATCC6303. Pneumococcal load in BALF was determined 12 hours after challenge. * indicates statistically significant difference with saline (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test). Symbols represent each individual. Means±standard errors are shown. Representative of two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g005>

Analysis of the overall survival after lethal pneumococcal challenge with ATCC6303 (serotype 3, PspA5) showed the induction of partial protection by NP/NCMP PspA4Pro and by subcutaneous inoculation of the purified protein. Furthermore, 12 hours after pneumococcal challenge, lower bacterial loads were detected in BALF of mice immunized with NP/NCMP PspA4Pro. At this time point, levels of IL-6, TNF- α , KC/CXCL1 and MIP-2/CXCL2 in BALF

Fig 6. Cytokine/chemokine levels in BALF collected 12 hours after lethal challenge with ATCC6303. Mice were immunized with 2 doses of the indicated formulations and challenged with pneumococcal strain ATCC6303. Levels of IL-6 (A), TNF- α (B), KC/CXCL1 (C) and MIP-2/CXCL2 (D) were determined in BALF collected 12 hours after challenge by Luminex. Naive mice were not immunized nor challenged. * indicates statistically significant difference (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test). Symbols represent each individual. Means $\pm$ standard errors are shown. Representative of two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g006>

Fig 7. Immunophenotyping of cells recovered in BALF collected 12 hours after lethal challenge with ATCC6303. Mice were immunized with 2 doses of the indicated formulations and challenged with pneumococcal strain ATCC6303. BALF was collected 12 hours after challenge and recovered cells were immunophenotyped by flow cytometry. Percentages of alveolar macrophages (AM—F4/80+ CD11c+ CD11b-) (A), exudate macrophages (EM—F4/80+ CD11c- CD11b+) (B), B cells (F4/80- B220+) (C), CD4+ T cells (F4/80- CD4+) (D), CD8+ T cells (F4/80- CD8+) (E) and neutrophils (F4/80- Ly6G+) (F) are shown. Means and standard errors of each group are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g007>

Fig 8. Pneumococcal load in BALF collected 24 hours after non-lethal challenge with EF3030. Mice were immunized with 2 doses of the indicated formulations and challenged with pneumococcal strain EF3030. Pneumococcal load in BALF was determined 24 hours after challenge. Symbols represent each individual. Means±standard errors are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191692.g008>

were higher in animals immunized with PspA4Pro sc compared to naive mice. These results indicate that although these immunization strategies induce similar final survival levels, lung immunization with protein-adsorbed NP/NCMPs induces an earlier control of the infection. It is possible that the higher anti-PspA4Pro IgG titers seen in BALF after immunization with NP/NCMP PspA4Pro into the lungs compared to PspA4Pro sc contribute to the earlier control of infection in that group. These results are in accordance with previous data from our group showing that protection against lethal pneumococcal challenge elicited by nasal immunization with a mixture of recombinant PspA and whole-cell pertussis vaccine correlated with early and controlled inflammatory responses in the lungs [28]. Analysis performed at several time points after challenge showed that protected animals had a controlled cellular infiltration, with neutrophil infiltration between 6 and 24 hours after challenge, peaking at 12 hours. Furthermore, there was controlled secretion of inflammatory cytokines in the lungs of immunized animals, with lower levels of IL-6 and TNF- α in BALF starting at 12 hours post challenge compared to control groups [28]. Studies using naive mice have also shown elevated levels of IL-6, IL-1 β , MCP-1, MIP-1, MIP-2 and KC in lung tissue starting at 24 hours post challenge in animals that do not control pneumococcal infection [29]. We did not observe any statistically significant difference between experimental groups in the immune cell subtypes infiltrated in BALF and this can be attributed to the time point used to phenotype cell subsets. It is interesting to note that the group immunized with NP/NCMP empty also showed lower bacterial load and reduced levels of proinflammatory cytokines and neutrophil chemoattractant chemokines at early stages of infection, indicating a role for non-specific responses. This early control of infection is not maintained at longer times after challenge though, since overall survival was not increased in this group. Polymeric NPs were previously shown to have adjuvant properties, which might explain the induction of non-specific innate responses by NP/NCMP empty [7].

Neither immunization with PspA4Pro sc nor NP/NCMP PspA4Pro led to reduced bacterial burden in BALF 24 hours after challenge with strain EF3030 (serotype 19F, PspA1), which was used in a non-lethal mouse model of pneumococcal infection. Immunization with NP/NCMP PspA4Pro thus induced protection against a strain expressing PspA from the homologous family 2 (ATCC6303, PspA5), but not against a strain expressing PspA from the heterologous family 1 (EF3030, PspA1). These results are in accordance with the binding of antibodies to strains expressing PspA from family 2 (PspA3, PspA4 and PspA5), but not to strains expressing PspA from family 1 (PspA1 and PspA2). The inclusion of PspAs from both families has indeed been proposed for a vaccine formulation with broad coverage [11]. Our group has shown that PspA4 is able to induce antibodies with broad reactivity [12], but this previous work was done using parenteral immunization with alum as adjuvant.

Since only protection against pneumococcal challenge with a strain expressing PspA from the homologous family was observed, further improvements in the formulation are needed. Besides the inclusion of a PspA from family 1, NPs composed of polymers other than PGA-co-PDL and/or the inclusion of adjuvants to the formulations may help in improving the immune response. In fact, the use of a TLR2-ligand adjuvant in a formulation delivered to the lungs elicited protective responses in mice against an aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* [30]. Delivery to the lungs of NPs conjugated with the tuberculosis antigen Ag85B with the adjuvant CpG elicited Th1 and Th17 responses that also led to enhanced protection against aerosol challenge with *M. tuberculosis* [31].

Vaccination targeting the lungs is thus a promising alternative to induce local immune responses against respiratory pathogens, including *M. tuberculosis*, influenza virus and *S. pneumoniae*. Furthermore, it is important to emphasize that lung immunization in humans is currently feasible due to the availability of several disposable devices. A large trial comparing measles vaccine by means of either aerosol inhalation with a nebulizer or subcutaneous

injection has already been performed in India, as part of the Measles Aerosol Vaccine Project coordinated by WHO [32], showing that mass immunization programs can be performed using lung vaccination.

Supporting information

S1 Fig. Distribution of dye after nasal instillation targeting the lungs. Lungs of a mouse after nasal instillation of 50 µl of 0.05% Evans Blue under anesthesia (B). Lungs of a control mouse are also shown (A).

(PDF)

S1 Table. Binding of IgG to intact pneumococci—Median Fluorescence Intensity (MFI).

(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Viviane M. Gonçalves, Daniela M. Ferreira, Nitesh K. Kunda, Imran Y. Saleem, Eliane N. Miyaji.

Formal analysis: Tasson C. Rodrigues, Maria Leonor S. Oliveira, Alessandra Soares-Schanoski, Eliane N. Miyaji.

Investigation: Tasson C. Rodrigues, Maria Leonor S. Oliveira, Alessandra Soares-Schanoski, Stefanni L. Chavez-Rico, Douglas B. Figueiredo, Eliane N. Miyaji.

Methodology: Tasson C. Rodrigues, Maria Leonor S. Oliveira, Alessandra Soares-Schanoski, Eliane N. Miyaji.

Project administration: Eliane N. Miyaji.

Resources: Eliane N. Miyaji.

Supervision: Eliane N. Miyaji.

Writing – original draft: Tasson C. Rodrigues, Maria Leonor S. Oliveira, Alessandra Soares-Schanoski, Viviane M. Gonçalves, Daniela M. Ferreira, Nitesh K. Kunda, Imran Y. Saleem, Eliane N. Miyaji.

Writing – review & editing: Tasson C. Rodrigues, Maria Leonor S. Oliveira, Alessandra Soares-Schanoski, Viviane M. Gonçalves, Daniela M. Ferreira, Nitesh K. Kunda, Imran Y. Saleem, Eliane N. Miyaji.

References

1. Loo JD, Conklin L, Fleming-Dutra KE, Deloria Knoll M, Park DE, Kirk J, et al. Systematic review of the effect of pneumococcal conjugate vaccine dosing schedules on prevention of pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2014; 33 Suppl 2:S140–51. Epub 2013/12/18. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000082> PMID: 24336056; PubMed Central PMCID: PMC3944478.
2. Bonten MJ, Huijts SM, Bolkenbaas M, Webber C, Patterson S, Gault S, et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *N Engl J Med*. 2015; 372(12):1114–25. Epub 2015/03/19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408544> PMID: 25785969.
3. Collaborators GMAcD. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388(10053):1459–544. Epub 2016/10/14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1) PMID: 27733281; PubMed Central PMCID: PMC5388903.
4. group Avftw. Developing aerosol vaccines for Mycobacterium tuberculosis: Workshop proceedings: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA, April 9, 2014. Vaccine.

- 2015; 33(26):3038–46. Epub 2015/04/15. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.060> PMID: 25869894.
5. Amorij JP, Hinrichs W, Frijlink HW, Wilschut JC, Huckriede A. Needle-free influenza vaccination. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10(10):699–711. Epub 2010/10/05. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70157-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70157-2) PMID: 20883966.
 6. Beverley PC, Sridhar S, Lalvani A, Tchilian EZ. Harnessing local and systemic immunity for vaccines against tuberculosis. *Mucosal immunology*. 2014; 7(1):20–6. Epub 2013/11/21. <https://doi.org/10.1038/mi.2013.99> PMID: 24253104.
 7. Kunda NK, Somavarapu S, Gordon SB, Hutcheon GA, Saleem IY. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. *Pharmaceutical research*. 2013; 30(2):325–41. Epub 2012/10/12. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0891-5> PMID: 23054093.
 8. Briles DE, King JD, Gray MA, McDaniel LS, Swiatlo E, Benton KA. PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. *Vaccine*. 1996; 14(9):858–67. Epub 1996/06/01. 0264410X96829483 [pii]. PMID: 8843627.
 9. Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, et al. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2003; 188(3):339–48. <https://doi.org/10.1086/376571> PMID: 12870114.
 10. Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000; 68(5):3028–33. Epub 2000/04/18. PMID: 10769009.
 11. 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. PMID: 10992499.
 12. 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. Epub 2010/01/22. CVI.00430-09 [pii] <https://doi.org/10.1128/CVI.00430-09> PMID: 20089795; PubMed Central PMCID: PMC2837969.
 13. Wu HY, Nahm MH, Guo Y, Russell MW, Briles DE. Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1997; 175(4):839–46. PMID: 9086139.
 14. Yamamoto M, Briles DE, Yamamoto S, Ohmura M, Kiyono H, McGhee JR. A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J Immunol*. 1998; 161(8):4115–21. Epub 1998/10/21. PMID: 9780183.
 15. 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. Epub 2013/03/06. <https://doi.org/10.1128/IAI.00240-13> PMID: 23460513; PubMed Central PMCID: PMC3647999.
 16. Fukuyama Y, Yuki Y, Katakai Y, Harada N, Takahashi H, Takeda S, et al. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal immunology*. 2015; 8(5):1144–53. Epub 2015/02/12. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.5> PMID: 25669148; PubMed Central PMCID: PMC4762909.
 17. Kunda NK, Alfagih IM, Miyaji EN, Figueiredo DB, Goncalves VM, Ferreira DM, et al. Pulmonary dry powder vaccine of pneumococcal antigen loaded nanoparticles. *International journal of pharmaceuticals*. 2015; 495(2):903–12. Epub 2015/09/22. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.034> PMID: 26387622.
 18. Anish C, Upadhyay AK, Sehgal D, Panda AK. Influences of process and formulation parameters on powder flow properties and immunogenicity of spray dried polymer particles entrapping recombinant pneumococcal surface protein A. *International journal of pharmaceuticals*. 2014; 466(1–2):198–210. Epub 2014/03/19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.025> PMID: 24631054.
 19. 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 biomaterialia*. 2013; 9(9):8262–71. Epub 2013/06/19. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.006> PMID: 23774257; PubMed Central PMCID: PMC3777629.
 20. Figueiredo DB, Carvalho E, Santos MP, Kraschowitz S, Zanardo RT, Campani G Jr., et al. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017; 101(6):2305–17. Epub 2016/11/28. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7983-9> PMID: 27889801.
 21. 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. Epub 2010/06/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010863> PMID: 20523738; PubMed Central PMCID: PMC2877721.
22. Ren B, Szalai AJ, Thomas O, Hollingshead SK, Briles DE. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2003; 71(1):75–85. Epub 2002/12/24. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.75-85.2003> PMID: 12496151; PubMed Central PMCID: PMC143380.
 23. Smith NM, Wasserman GA, Coleman FT, Hilliard KL, Yamamoto K, Lipsitz E, et al. Regionally compartmentalized resident memory T cells mediate naturally acquired protection against pneumococcal pneumonia. *Mucosal immunology*. 2017. Epub 2017/05/18. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.43> PMID: 28513594.
 24. Wang Y, Jiang B, Guo Y, Li W, Tian Y, Sonnenberg GF, et al. Cross-protective mucosal immunity mediated by memory Th17 cells against *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Mucosal immunology*. 2017; 10(1):250–9. Epub 2016/04/28. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.41> PMID: 27118490; PubMed Central PMCID: PMC5083242.
 25. Menzel M, Muellinger B, Weber N, Haeussinger K, Ziegler-Heitbrock L. Inhalative vaccination with pneumococcal polysaccharide in healthy volunteers. *Vaccine*. 2005; 23(43):5113–9. Epub 2005/07/21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.040> PMID: 16029914.
 26. Meyer P, Menzel M, Muellinger B, Weber N, Haeussinger K, Ziegler-Heitbrock L. Inhalative vaccination with pneumococcal polysaccharide in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Vaccine*. 2006; 24(31–32):5832–8. Epub 2006/06/06. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.002> PMID: 16750285.
 27. Gordon SB, Malamba R, Mithunthama N, Jarman ER, Jambo K, Jere K, et al. Inhaled delivery of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine does not result in enhanced pulmonary mucosal immunoglobulin responses. *Vaccine*. 2008; 26(42):5400–6. Epub 2008/08/19. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.082> PMID: 18708114; PubMed Central PMCID: PMC2612086.
 28. 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. Epub 2012/07/05. <https://doi.org/10.1128/CVI.00171-12> PMID: 22761301; PubMed Central PMCID: PMC3428385.
 29. Dallaire F, Ouellet N, Bergeron Y, Turmel V, Gauthier MC, Simard M, et al. Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*. 2001; 184(3):292–300. Epub 2001/07/10. JID001484 [pii] <https://doi.org/10.1086/322021> PMID: 11443554.
 30. Tyne AS, Chan JG, Shanahan ER, Atmosukarto I, Chan HK, Britton WJ, et al. TLR2-targeted secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* are protective as powdered pulmonary vaccines. *Vaccine*. 2013; 31(40):4322–9. Epub 2013/07/25. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.022> PMID: 23880366.
 31. Ballester M, Nembrini C, Dhar N, de Titta A, de Piano C, Pasquier M, et al. Nanoparticle conjugation and pulmonary delivery enhance the protective efficacy of Ag85B and CpG against tuberculosis. *Vaccine*. 2011; 29(40):6959–66. Epub 2011/07/27. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.039> PMID: 21787826.
 32. Low N, Bavdekar A, Jeyaseelan L, Hirve S, Ramanathan K, Andrews NJ, et al. A randomized, controlled trial of an aerosolized vaccine against measles. *N Engl J Med*. 2015; 372(16):1519–29. Epub 2015/04/16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407417> PMID: 25875257.